

Auxiliar-vermittelte Peptidfragmentverknüpfung:

**Synthese und Anwendung leistungsfähiger N^α-Auxiliare für die erweiterte native
chemische Peptidligation**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl. Chem. Simon Ferdinand Loibl

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz
 2. Prof. Dr. Hans Börner
 3. Prof. Dr. Armin Geyer

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2017

Zusammenfassung

Chemoselektive Peptidfragmentverknüpfungsmethoden sind ein zentrales Element der chemischen Peptid- und Proteinsynthese. Auf der Suche nach einem „universellen Werkzeug für die Peptidligation“ wurde in den vergangenen zwei Jahrzehnten eine Vielzahl unterschiedlicher Hilfsmolekülen (Auxiliare) entwickelt. Trotz des enormen Forschungsaufwandes blieben bisher verfügbare N^α -Auxiliare jedoch in ihrer Anwendung auf glycinhaltige Ligationsstellen beschränkt. Im Fall der häufig verwendeten säurelabilen N^α -Auxiliare müssen zudem starke Säuren oder Supersäuren eingesetzt werden, um das Hilfsmolekül nach der Peptidligation zu entfernen. Dabei wurde häufig die Spaltung der zuvor aufgebauten Amidbindung als unerwünschte Nebenreaktion beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese von acht N^α -Auxiliaren erarbeitet und deren Anwendung in der erweiterten nativen chemischen Ligation untersucht. Dabei konnten sechs Hilfsmoleküle identifiziert werden, welche die Auxiliar-Abspaltung unter mild-basischen Bedingungen ermöglichten. Von besonderer Bedeutung war das 2-Mercapto-2-phenethyl-Grundgerüst, welches im Gegensatz zu bisher beschriebenen N^α -Auxiliaren erstmals den Zugang zu sterisch anspruchsvollen Verknüpfungstellen, jenseits von Glycin, gestattete. Der Nutzen des Auxiliars wurde in die chemische Totalsynthese zweier antimikrobieller Peptide demonstriert. Durch die Verwendung eines ^{13}C -markierten Hilfsmoleküls konnte der Mechanismus der radikalischen Auxiliar-Abspaltungsreaktion in NMR-Experimenten detailliert untersucht werden. Zusätzlich wurde das 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliar in einer neuen Methode der chemischen Proteinsynthese eingesetzt, welche die gewünschten Proteine ohne eine einzige HPLC-Reinigung in reiner Form lieferte. Im letzten Teil der Arbeit wurde mit dem 2-Selenol-2-phenethyl-Grundgerüst erstmals die Anwendung eines Selenol-funktionalisierten N^α -Auxiliars beschrieben. Das Hilfsmolekül ermöglichte besonders schnelle Verknüpfungsreaktionen und konnte zudem rasch mit hoher Selektivität entfernt werden.

Schlüsselwörter: N^α -Auxiliar, native chemische Ligation, erweiterte Peptidligation, Peptidsynthese, chemische Proteinsynthese, Entschwefelung, Deselenierung, Radikalreaktion

Summary

Chemoselective ligation methods are an essential element of chemical peptide and protein synthesis. The search of a „universal tool for peptide ligation“ led to a range of different ligation auxiliaries over the last two decades. Despite the intense research in this field established N α -auxiliaries remained limited to glycine-containing ligation sites. Furthermore, the application of frequently used acid-labile N α -auxiliaries requires strong acids or superacids to remove the auxiliary after the ligation reaction. Under these harsh acidic conditions the cleavage of the established amide bond has been observed as an undesired side-reaction.

This work describes the synthesis of eight N α -auxiliaries and their application in extended native chemical ligation. Six helping molecules were identified enabling auxiliary cleavage under mild-basic conditions. Perhaps most important and in contrast to previously reported N α -auxiliaries, the 2-mercapto-2-phenethyl group facilitated access to sterically demanding ligation sites, beyond glycine. The synthetic utility of the auxiliary was demonstrated by the chemical total synthesis of two antimicrobial peptides. The application of a ^{13}C -labelled scaffold allowed a detailed study of the radical auxiliary cleavage reaction by NMR-spectroscopy. Additionally, the 2-mercapto-2-phenethyl auxiliary was utilised for a novel method of chemical protein synthesis, which delivered the desired proteins without a single HPLC-purification in high purity. Finally, a selenol-functionalized N α -auxiliary is described for the first time by introducing the 2-selenol-2-phenethyl moiety. This scaffold enabled exceptionally rapid peptide ligations and is readily removed with high selectivity.

Key words: N α -auxiliary, native chemical ligation, extended peptide ligation, peptide synthesis, chemical protein synthesis, desulfurization, deselenation, radical reaction

Die experimentellen Arbeiten dieser Disseration wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut der Chemie im Fachinstitut der Bioorganischen Synthese der Humboldt-Universität zu Berlin von Januar 2012 bis Januar 2017 durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Stand der Forschung	3
2.1. Chemische Totalsynthese von Proteinen	3
2.2. Chemoselektive Peptidfragmentverknüpfungs-Methoden	6
2.2.1. Native chemische Peptidligation	7
2.2.2. Erweiterte native chemische Peptidligation (ENCL)	8
2.2.3. Peptidligation auf der festen Phase	18
3. Zielstellung	21
4. Ergebnisse und Diskussion	25
4.1. Basenlabile Auxiliare für die ENCL	25
4.1.1. Konzept der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare ...	25
4.1.2. Synthese der 6-Ring-bildenden Auxiliarpeptide	26
4.1.3. Anwendung der 6-ringbildenden Auxiliarpeptide in der Peptidligation	30
4.1.4. Abspaltung der 6-ringbildenden Auxiliare	31
4.1.5. Konzept des 5-ringbildenden <i>para</i> -Nitrophenyl-Auxiliars	42
4.1.6. Synthese von 5-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliarpeptide.....	42
4.1.7. Vergleich der 5- und 6-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliare in ENCL-Reaktionen	44
4.1.8. Abspaltung des 5-ringbildenen Nitrophenyl-Auxiliars.....	46
4.1.9. Diskussion des Auxiliar-Abspaltungsmechanismus	50
4.1.10. Zusammenfassung des Kapitels 4.1.....	52
4.2. Radikalisch spaltbare N ^α -Auxiliare für die ENCL.....	54
4.2.1. Synthese der 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliarpeptide	55
4.2.2. Anwendung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars in ENCL-Reaktionen.....	57
4.2.3. Abspaltung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars	59

4.2.4. Abspaltung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation	66
4.2.5. Anwendung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars in der chemischen Synthese antimikrobieller Peptide	69
4.2.6. Grenzen des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars in ENCL-Reaktionen	76
4.2.7. Auxiliar-Abspaltung in Gegenwart von Cystein-Resten	78
4.2.8. Mechanistische Untersuchung der Auxiliar-Abspaltungsreaktion.....	80
4.2.9. Substitution der Phenylgruppe: Synthese und Einsatz des 2-Mercapto-ethyl- und des 2-Mercapto-propyl-Auxiliars für die ENCL	89
4.3. Chemische Proteinsynthese ohne HPLC-Reinigung	98
4.4. Synthese und Anwendung des 2-Selenol-2-phenyl-ethyl-Auxiliars.....	109
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	119
5.1. Zusammenfassung	119
5.2. Ausblick	130
6. Experimenteller Teil	132
6.1. Reagenzien und Lösungsmittel	132
6.2. Analytische Methoden	132
6.3. Präparative Methoden	134
6.4. Festphasenpeptidsynthese	134
6.4.1. Fmoc-basierte Peptidsynthese	134
6.4.2. Boc-basierte Peptidsynthese.....	137
6.5. Standardprotokoll für Auxiliar-vermittelte Peptidligationen.....	139
6.6. Standardprotokoll für Auxiliar-Abspaltungsreaktionen.....	140
6.7. Synthese der Modelpeptidthioester	141
6.8. Synthese und Anwendung der 6-ringbildenden Auxiliare	145
6.8.1. Synthese der Auxiliar-Glycin-Konjugate	145
6.8.2. Synthese der 6-ringbildenden Auxiliarpeptide.....	151

6.8.3. Synthese der 6-Ring-Auxiliar-modifizierten Ligationsprodukte	153
6.8.4. Abspaltung des 6-Ring Nitrophenyl-Auxiliars im präparativen Maßstab	155
6.9. Synthese und Anwendung des 5NP-Auxiliars	157
6.9.1. Synthese des Auxiliar-Vorläufermoleküls 57	157
6.9.2. Synthese der 5NP-Auxiliarpeptide	158
6.9.3. Anwendung des 5NP-Auxiliars	159
6.10. Vergleich des 5NP- und 6NP-Auxiliars in ENCI-Reaktionen	161
6.11. Abspaltung des 5NP- und 6NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation	163
6.11.1. Ergänzende Analytik zu Kapitel 4.1	164
6.12. Synthese und Anwendung des 2MPE-Auxiliars	169
6.12.1. Synthese des 2MPE-Vorläufermoleküls	169
6.12.2. Synthese der 2MPE-Auxiliarpeptide	172
6.12.3. Einsatz des 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen	177
6.12.4. Synthese der 2MPE-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte	180
6.12.5. Abspaltung des 2MPE-Auxiliars an gereinigten Ligationsprodukten	183
6.12.6. Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation .	184
6.12.7. Anwendung des 2MPE-Auxiliars in der chemischen Synthese antimikrobieller Peptide	191
6.12.8. Grenzen des 2MPE-Auxiliars und Abspaltung in Gegenwart von Cystein-Resten	200
6.12.9. Mechanistische Untersuchungen der Auxiliar-Abspaltungsreaktion	201
6.12.10. Ergänzende Analytik zu Kapitel 4.2	204
6.13. Synthese und Anwendung des 2ME-Auxiliars	206
6.13.1. Synthese des 2ME-Vorläufermoleküls 139	206
6.13.2. Synthese der 2ME-Auxiliarpeptide	207
6.13.3. Vergleich des 2MPE- und 2ME-Auxiliars in ENCL-Reaktionen	209

6.13.4. Synthese der 2ME-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte	210
6.13.5. Abspaltung des 2ME-Auxiliars	213
6.14. Synthese und Anwendung des 2MP-Auxiliars	214
6.14.1. Synthese des 2MP-Vorläufermoleküls.....	214
6.14.2. Synthese der 2MP-Auxiliarpeptide	216
6.14.3. Einsatz des 2MP-Auxiliars in ENCL-Reaktionen.....	217
6.14.4. Abspaltung des 2MP-Auxiliars.....	219
6.15. HPLC-freie Proteinsynthese.....	221
6.15.1 Synthese der His ₆ -MUC1-Peptidthioester 161a-c.....	221
6.15.2. Untersuchung der Racemisierung von C-terminalen His-Resten im Zuge der Thioestersynthese	223
6.15.3. Affinitätschromatographie-basierte Reinigung der Peptidthioester.....	224
6.15.4. Synthese der MUC1-Auxiliarpeptide 162a-c	226
6.15.5. Trifluoracetylierung von C-terminalen Peptidhydraziden durch TFA-Behandlung	228
6.15.6. Optimierung der Peptidligation an der festen Phase	230
6.15.7. Protokoll für die HPLC-freie Synthese der MUC1-Proteine	232
6.15.8. Anwendung der HPLC-freien Proteinsynthese	234
6.15.9. Reinigung durch Reaktivitätsmarkierung als Alternative zur HPLC-basierten Reinigung.....	240
6.16. Synthese und Anwendung des 2SPE-Auxiliars	241
6.16.1. Synthese des 2SPE-Auxiliar-Vorläufermoleküls.....	241
6.16.2. Synthese des 2SPE-Auxiliarpeptids	244
6.16.3. Anwendung des 2SPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen	245
7. Anhang.....	248
8. Abkürzungsverzeichnis.....	271
9. Literaturverzeichnis	275

1. Einleitung

Proteine übernehmen eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen im Körper des Menschen. Neben den für das menschliche Auge sichtbaren Aufgaben, wie beispielsweise deren Funktion als Strukturproteine der Haut oder Faserproteine der Haare, sind Proteine auch auf molekularer Ebene an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Als Hauptbestandteile von Enzymen ermöglichen sie die Katalyse biochemischer Reaktionen oder regulieren als Transmembranproteine den Stofftransport über das Membransystem der Zelle. Aber auch außerhalb der Zelle transportieren Proteine (Transportproteine) wichtige Moleküle wie beispielsweise Sauerstoff (Hämoglobin) oder Eisen (Transferrin). Für das Immunsystem des Menschen spielen Proteine in Form von Antikörpern oder als Vorläufer antimikrobieller Peptide eine essentielle Rolle. Die jeweilige Funktion eines Proteins basiert auf dessen Struktur im gefalteten Zustand, welche hauptsächlich durch die Primärsequenz der einzelnen Aminosäuren festgelegt wird.^[1] Eine genaue Kenntnis des Zusammenhangs zwischen der Struktur und der Funktion eines Proteins ist nicht nur notwendig, um ein besseres Verständnis biologischer Prozesse zu erhalten, sondern ist auch die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Um derartige Struktur-Funktion-Analysen zu ermöglichen, muss das zu untersuchende Protein in ausreichender Menge und hoher Reinheit verfügbar sein. Die Synthese von Proteinen kann über zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden erfolgen: Die rekombinante Proteinsynthese ist ein biotechnologisches Verfahren bei dem die Herstellung der Proteine mit Hilfe von Bakterien, Pilzen oder Zellkulturen erfolgt. Durch gezielte Einführung der genetischen Information des Zielproteins in den Wirtsorganismus wird der entsprechende Expressionsorganismus erzeugt, welcher anschließend die gewünschten Proteine produziert.^[2] Aufgrund des geringen Kostenaufwandes und der hohen Produktivität ist die rekombinante Proteinsynthese ein häufig angewandtes Verfahren auch im industriellen Umfeld.^[3] Allerdings sind routinemäßige Verfahren auf den Einbau von natürlichen Aminosäuren beschränkt.^[4] Im Gegensatz dazu ermöglicht die chemische Totalsynthese einen robusten Zugang zu modifizierten Proteinen, welche je nach Bedarf mit Reportergruppen, posttranslationalen Proteinmodifikationen (PTMs) oder anderen chemischen Funktionalitäten ausgestattet werden können. Durch die Möglichkeit der ortsspezifischen Einführung chemischer Modifikationen kann beispielsweise die Rolle einzelner Aminosäuren oder PTMs in einem Protein untersucht werden. Die Analyse solcher

Prozesse erfolgt häufig durch sogenannte Peptidarrays, wobei eine Vielzahl unterschiedlicher Peptide oder Proteine gleichzeitig untersucht wird. Als Herausforderung steht in diesem Fall die chemische Synthese einer großen Anzahl unterschiedlicher Proteine im Vordergrund, was im Idealfall durch parallele Synthesestrategien erreicht werden kann.^[5] Für diese Anwendungen werden meist nur geringe Mengen der zu untersuchenden Peptide oder Proteine benötigt. Im Gegensatz dazu kann das Potential der chemischen Totalsynthese auch in industriellen Prozessen zur Produktion einzelner Peptide im Tonnenmaßstab entfaltet werden. Ein beeindruckendes Beispiel dafür liefert die Synthese des HIV-Fusionsinhibitors Enfuvirtid (Handelsname *Fuzeon*) der Firma *Hoffmann-LaRoche*. Hierbei werden unter Anwendung linearer Festphasenpeptidsynthese und anschließender Fragmentverknüpfung jährlich mehrere Tonnen des Peptid-Therapeutikums produziert.^[6] Neben der hohen Flexibilität des Synthesemaßstabes ermöglicht die chemische Peptidsynthese die gezielte Verbesserung Peptid-basierter Wirkstoffe, welche aufgrund der körpereigenen Proteasen meist nur eine geringe metabolische Stabilität besitzen. Diesem Problem kann durch Einsatz von D-Aminosäuren, Polyethylenglykol-Einheiten („PEGylierung“), N-Methylierung oder cyclischer Peptidstrukturen entgegen gewirkt werden.^[4] Ob für die Synthese kurzer pharmazeutischer Peptide oder großer Proteinstrukturen, in beiden Fällen erfolgt die chemische Totalsynthese häufig über konvergente Synthesestrategien, um die Probleme einer reinen linearen Syntheseroute zu umgehen. Dabei werden zuerst einzelne Peptidfragmente synthetisiert und anschließend unter Bildung des Volllängen-Peptids/Proteins miteinander verknüpft. Für die chemoselektive Verknüpfung ungeschützter Peptidfragmente ist die native chemische Peptidligation (NCL) die Methode der Wahl.^[7] Allerdings ist die Anwendung der NCL auf cysteinhaltige Verknüpfungsstellen beschränkt, welche aufgrund des geringen Vorkommens von Cystein in Proteinen eher selten zu finden sind. Eine Möglichkeit diese Einschränkung zu umgehen ist der Einsatz von N^{α} -Auxilliaren.^[8] Bisher verfügbare Auxiliare waren jedoch auf einfache glycinhaltige Verknüpfungsstellen beschränkt.^[9] Um das volle Potential der Auxiliar-vermittelten Peptidligation entfalten zu können, sollten in der vorliegenden Arbeit leistungsfähige Auxiliare für die erweiterte NCL jenseits von Cystein und Glycin entwickelt werden.

2. Stand der Forschung

2.1. Chemische Totalsynthese von Proteinen

Die chemische Totalsynthese ermöglicht die schnelle und die zuverlässige Darstellung von Peptiden und Proteinen mit definierter Struktur und hoher Reinheit. Zusätzlich erlaubt die dieses Verfahren den gezielten Einbau funktioneller Gruppen mit atomarer Präzision. Die Reichweite der chemischen Peptidsynthese konnte seit Beginn des 20. Jahrhundert durch andauernde Forschungsarbeit enorm erweitert werden. Diese Entwicklung lässt sich anhand der ersten Synthese eines Glycin-Glycin Dipeptids von Fischer^[10] (1901) bis hin zum vollsynthetisch dargestellten 304 Aminosäuren langen Tetraubiquitin-Protein (2011) von Brik *et al.*^[11] deutlich erkennen. Die chemische Peptidsynthese wurde zuerst mittels organischer Synthese in Lösung vorangetrieben. Dabei werden in der Regel kurze vollständig geschützte Peptidfragmente in Lösung synthetisiert und anschließend miteinander verknüpft. Stellvertretend für diese Synthesestrategie steht das Beispiel der chemischen Totalsynthese der Ribonuclease A von Fujii *et al.*. In dieser Arbeit wurde das aus 124 Aminosäuren bestehende Protein durch Verknüpfung von 30 geschützten Peptidfragmenten, anschließender Entfernung der Schutzgruppen und Anwendung diverser Reinigungsschritte in kristalliner Form erhalten.^[12] Die Darstellung großer Proteine durch die Verknüpfung geschützter Peptidfragmente in Lösung ist jedoch mit einer Reihe von Problemen verbunden, welche hauptsächlich aus der geringen Löslichkeit der vollständig geschützten Peptidfragmente resultieren.^[13] Zum einen müssen die Verknüpfungsreaktionen teilweise in sehr niedrigen Konzentrationen durchgeführt werden, um die Fragmente vollständig in Lösung zu bringen. Die daraus resultierenden langen Reaktionszeiten sind häufig mit Nebenreaktionen, wie beispielsweise der Racemisierung am C-Terminus des aktivierten Peptidfragments, verbunden. Zum anderen ist die Analyse und Reinigung im Vergleich zu ungeschützten Peptidfragmenten deutlich erschwert. Die äußerst zeitaufwendigen Reinigungsschritte und anspruchsvollen Reaktionsführungen erfordern ein hohes Maß an chemischen Wissen und synthetischen Fähigkeiten, weshalb für erfolgreiche Synthesen häufig eine Vielzahl talentierter Chemiker benötigt wurden.^[14]

Um diesem Problem entgegenzuwirken entwickelte Merrifield die sogenannte Festphasenpeptidsynthese^[15] (SPPS, *solid phase peptide synthesis*) welche den Prozess der

Peptidsynthese erheblich vereinfachte. Das zentrale Element der SPPS ist ein leicht filtrierbares Polymerharz auf welchem der sequentielle Aufbau des Zielpeptids erfolgt. Im ersten Schritt wird die N^α-geschützte C-terminale Aminosäure durch Ausbildung einer kovalenten Bindung fest mit dem funktionalisierten Trägerharz verbunden (Abbildung 1). Das verbleibende Reaktionsgemisch wird per Filtration entfernt und der polymere Träger mehrmals mit organischen Lösungsmitteln gewaschen. Anschließend wird die N^α-Schutzgruppe entfernt („Deblockierung“), der polymere Träger gewaschen und die zweite N^α-geschützte Aminosäure gekuppelt („Kupplung“). Nach dem Kupplungsschritt kann optional eine Behandlung des Harzes mit Essigsäureanhydrid erfolgen, um verbleibende freie Aminofunktionen zu blockieren („Acetylierung“) und dadurch die Entstehung von Fehlsequenzen verhindert werden. Durch iterative Anwendung der genannten Elementarschritte erfolgt der vollständige Aufbau des Zielpeptids auf dem polymeren Träger. Im letzten Schritt wird das Volllängenpeptid vom polymeren Träger unter gleichzeitiger Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen entfernt und anschließend gereinigt. Die rasche und einfache Abtrennung der eingesetzten Reagenzien, Lösungsmittel sowie der anfallenden Nebenprodukte per Filtration verringert den Arbeitsaufwand einer SPPS-basierten Peptidsynthese im Vergleich zur Peptidsynthese in Lösung um einen Faktor von ca. 50. ^[16] Darüber hinaus können die benötigten Reagenzien ohne Probleme im Überschuss eingesetzt werden, um quantitative Umsätze der einzelnen Reaktionen zu forcieren, wodurch die Reinheit des erhaltenen Rohproduktes erhöht und die finale Isolierung des Zielpeptids vereinfacht wird. Zusätzlich bietet die einfache Handhabung der SPPS auch den Naturwissenschaften jenseits der Chemie einen zuverlässigen Zugang zu Peptiden und Proteinen. Ein weiterer Vorteil ist die Automatisierbarkeit der SPPS, welche schon zu Beginn von Merrifield als Ziel formuliert und später realisiert wurde.^[15, 17] Heutzutage stehen Syntheseautomaten für die Boc/Bzl- und Fmoc/*t*Bu-basierte SPPS zur Verfügung. Diese beiden Schutzgruppenstrategien wurden in den vergangenen Jahrzehnten als routinemäßige Methoden etabliert und unterscheiden sich in einigen Punkten grundsätzlich voneinander: Im Fall der Boc/Bzl-Strategie erfolgt die Entschützung der N^α-Schutzgruppe (Boc) unter sauren Bedingungen, meist durch Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA). Im Anschluss an die SPPS müssen toxische Säuren, wie Fluorwasserstoff oder Trifluormethansulfonsäure (TFMSA), verwendet werden, um das Volllängenpeptid vom polymeren Träger abzuspalten und die Benzyl-basierten Seitenkettenschutzgruppen zu entfernen. Unter diesen Bedingungen

kann es zu Nebenreaktionen an dem Zielpeptid (Acetylierung, Alkylierung, Aspartimid-Bildung etc.) kommen, wodurch die Anwendung der Boc-basierten SPPS beschränkt wird.^[18] Zusätzlich erfordert der Einsatz von Fluorwasserstoff eine spezielle Ausstattung der Laboratorien. Erst kürzlich wurde eine Methode vorgestellt, welche die Verwendung von Fluorwasserstoff durch den Einsatz von Trimethylsilylbromid umgeht und zugleich die Synthese posttranslational-modifizierter Proteine nach der Boc-Strategie erlaubt.^[19] Für die Synthese von schwierigen Peptidsequenzen bleibt die Boc-Strategie dennoch die Methode der Wahl, da die wiederholte Behandlung mit TFA im Zuge der SPPS der Aggregation der wachsenden Peptidkette entgegenwirkt.^[20] Im Unterschied zur Boc/Bzl-Strategie kommt bei der Fmoc/tBu-basierten SPPS eine orthogonale Schutzgruppenstrategie zum Einsatz. Die N^α -Schutzgruppe (Fmoc) wird unter basischen Bedingungen, meist durch Verwendung einer nukleophilen Base wie Piperidin, entfernt. Im letzten Schritt der SPPS erfolgt die Deblockierung der Seitenketten und die Abspaltung des Volllängenpeptids vom polymeren Träger unter sauren Bedingungen. Neben den milderen Bedingungen (kein Einsatz von Supersäuren) bietet die Fmoc-basierte SPPS aufgrund der orthogonalen Schutz-

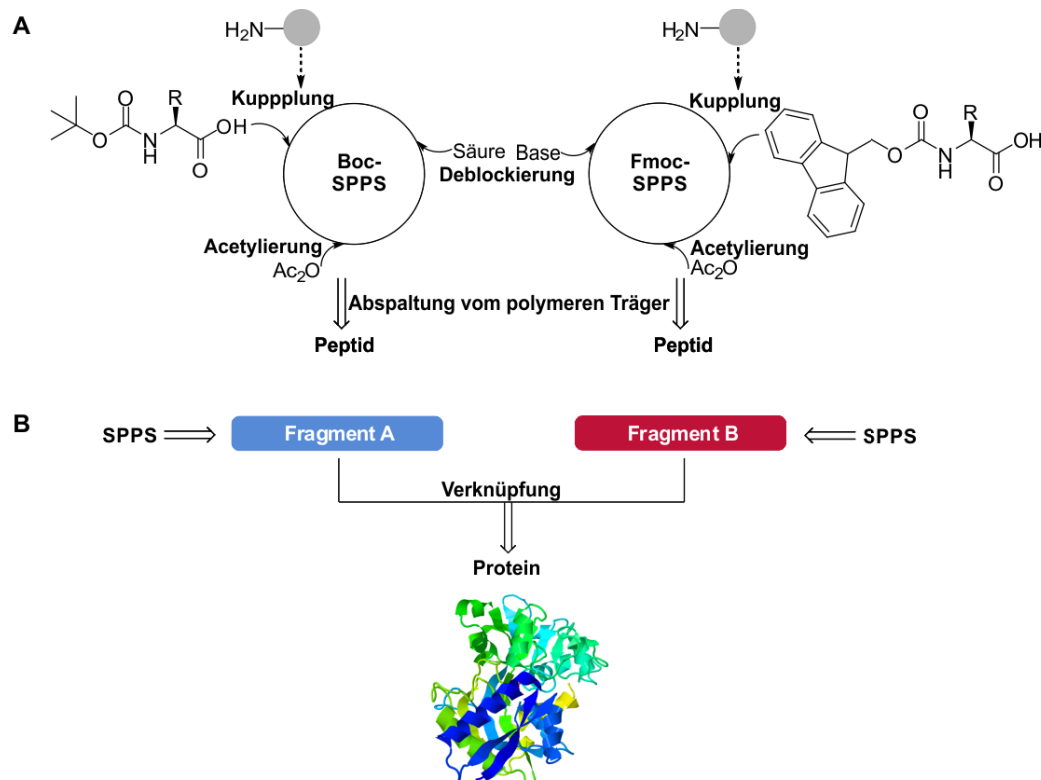


Abbildung 1: Konzept der Boc- und Fmoc-basierten SPPS (A) und konvergente Synthese von Proteinen durch Einsatz von SPPS mit anschließender Verknüpfung beider Fragmente (B). Gezeigt ist die Struktur von Transferrin.^[21]

gruppenstrategie deutlich mehr Spielraum für komplexe Synthesestrategien.^[22] Bedingt durch die stetige Verbesserung der eingesetzten polymeren Träger, Kupplungsreagenzien, Aminosäure-Bausteine und Syntheserobotern ist die routinemäßige Synthese kurzen Peptiden/Proteinen mittels SPPS in der Regel unproblematisch. Im Fall von schwierigen Sequenzen oder längeren Proteinen können jedoch Probleme wie unvollständige Kupplungs- und Entschützungsreaktionen oder Aggregation der wachsenden Peptidkette auftreten. In solchen Fällen kann entweder eine Optimierung des Syntheseprotokolles, beispielsweise durch Anpassung der Reaktionszeiten, dem Einsatz von Mikrowellenreaktoren^[23] oder der Verwendung spezieller SPPS-Monomere^[24] (wie beispielsweise Isoacyl-^[25], Pseudoprolin-^[26] oder 2,4-Dimethoxybenzyl^[27]-Dipeptide) erfolgen. Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung einer konvergenten Synthesestrategie (siehe Abbildung 1). Dabei werden zuerst einzelne Peptidfragmente mittels linearer SPPS erhalten und anschließend unter Verwendung sogenannter Peptidfragmentverknüpfungs-Methoden miteinander verknüpft.

2.2. Chemoselektive Peptidfragmentverknüpfungs-Methoden

Für die Verknüpfung von Peptidfragmenten können folgende, grundsätzlich verschiedene Methoden gewählt werden: Zum einen können vollständig geschützte Peptidfragmente zum Einsatz kommen. Hierbei wird beispielsweise das N-terminale Fragment als α -Aktivester direkt mit der α -Aminogruppe des C-terminalen Fragments zur Reaktion gebracht. In diesem Fall sind die Anforderungen an die Chemoselektivität gering, da nur zwei reaktive Gruppen in der Reaktionsmischung präsent sind. Wie bereits in Abschnitt 2.1 erwähnt, kann die Anwendung dieser Verknüpfungsstrategie aufgrund der geringen Löslichkeit vollständig geschützter Fragmente und der potentiellen Racemisierung der aktivierten C-terminalen Aminosäure problematisch sein.^[3b, 28] Im Gegensatz dazu erlaubt der Einsatz ungeschützter Peptidfragmente die Reaktionsführung in wässrigen Lösungen und bei relativ hohen Konzentrationen (durch Verwendung denaturierender Salze) der beiden Reaktanden. Aufgrund der Vielzahl funktioneller Gruppen muss die Verknüpfungsreaktion in diesem Fall vollständig chemoselektiv verlaufen, um ein strukturell eindeutig definiertes Ligationsprodukt zu erhalten. Darüber hinaus muss die Peptidfragmentverknüpfung nicht zwingend in Lösung erfolgen, sondern kann auch auf einem polymeren Träger stattfinden (siehe Kapitel 2.2.3). Außerdem muss zwischen Ligationsmethoden unterschieden werden, welche die

Fragmente durch Ausbildung einer Amid-Bindung miteinander verknüpfen und Methoden bei denen eine Verknüpfung über andere kovalenten Bindungstypen (zum Beispiel Thioether, Oxime, Triazole) erfolgt.^[29] Für die chemische Synthese von nativen Proteinstrukturen sind ausschließlich die Amid-basierten Ligationsmethoden von Bedeutung, weshalb nur diese im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

2.2.1. Native chemische Peptidligation

Die wohl wichtigste Methode zur chemoselektiven Verknüpfung von Peptidfragmenten ist die sogenannte native chemische Peptidligation (NCL). Im ersten Schritt dieser Reaktion (Abbildung 2) erfolgt ein Thiol-Austausch zwischen dem C-terminalen α -Peptidthioester und dem N-terminalen Cysteinylpeptid unter Ausbildung des Thioester-verknüpften Intermediates. Durch den nachfolgenden intramolekularen S \rightarrow N-Acyltransfer entsteht schließlich das Amid-verknüpfte Ligationsprodukt. Die NCL verläuft in wässrigen Puffersystemen, unter milden Reaktionsbedingungen (pH 6.8-7.5, 25°C) und ermöglicht in der Regel nahezu quantitative Reaktionsumsätze.^[7, 30] Die Reaktionsgeschwindigkeit der NCL wird maßgeblich durch den pH-Wert^[7], den sterischen Anspruch der C-terminalen Aminosäure des Peptidthioesters^[30] und den eingesetzten Thiol-Additiven^[31] beeinflusst. Als Thiol-Additive werden meist Arylthiole, wie Thiophenol oder 4-Mercaptophenylelessigsäure (MPAA), verwendet. Diese NCL-Katalysatoren werden im Überschuss eingesetzt und bilden *in-situ*, durch eine Thiolaustauschreaktion, reaktive Arylpeptidthioester, welche aufgrund ihrer guten Fluchtgruppeneigenschaften rasch mit den Cysteinylpeptiden reagieren.^[31] Die Limitierung der NCL auf cysteininhaltige Ligationstellen stellt ein erhebliches Problem dieser Methode dar, da Cystein mit einer natürlichen Häufigkeit von 1.7%^[32] nur relativ selten in Proteinen vorkommt. Zusätzlich können die Cystein-Reste für Verknüpfungsreaktionen ungünstig

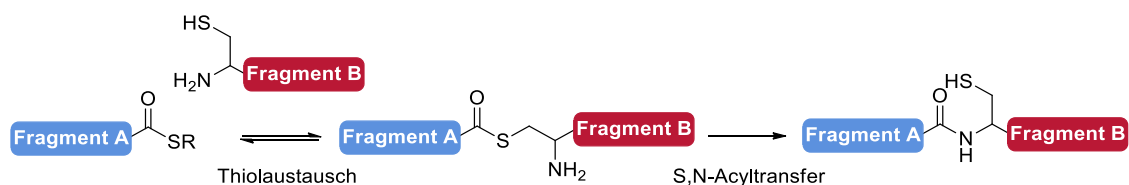


Abbildung 2: Mechanismus der nativen chemischen Peptidligation: Der Thiolaustausch zwischen dem Peptidthioester und dem Cysteinylpeptid ergibt zunächst das Thioester-Intermediat, welches nachfolgend zum Amid-verknüpften Ligationssprodukt umlagert.

positioniert sein, wie beispielsweise im Fall von Pro-Cys- und Ile-Cys-Ligationsstellen (langsame NCL-Reaktion)^[30]. Ebenfalls problematisch ist die Anwendung der NCL an Asp-Cys-, Asn-Cys- und Glu-Cys-Verknüpfungstellen, da hierbei β - und γ -verknüpfte Ligationsprodukte entstehen können.^[33] Um das Problem der beschränkten Anwendbarkeit zu lösen, wurden in den vergangenen 20 Jahren eine Vielzahl von Methoden entwickelt, welche die Reichweite der NCL über Cystein hinaus erweiterten.

2.2.2. Erweiterte native chemische Peptidligation (ENCL)

Eine Möglichkeit, die Beschränkung der NCL auf cysteinhaltige Ligationsstellen aufzuheben, ist der Einsatz von erweiterten NCL (ENCL)-Methoden. Eine wichtige Methode der ENCL ist die sogenannte Ligations-Entschwefelungs-Strategie (Abbildung 3). Hier werden Thiol-modifizierte Aminosäuren am N-Terminus des C-terminalen Fragments genutzt, um die Verknüpfungsreaktion mit dem Peptidthioester zu ermöglichen. Analog zur NCL, werden im ersten Schritt die zu verknüpfenden Peptidfragmente durch die chemoselektive Thiolaustausch-Reaktion in geeignete räumliche Nähe gebracht. Anschließend erfolgt durch einen intramolekularen S \rightarrow N-Acyltransfer die Ausbildung der Amidbindung. Um das native Protein zu erhalten, erfolgt im Anschluss an die Ligation die Entfernung der nun überflüssigen Thiol-Funktion („Entschwefelung“). Diese Strategie wurde erstmals von *Dawson* vorgestellt, wobei die Entschwefelung der cysteinhaltigen Ligationsprodukte zu den nativen Alanin-Peptiden hydrogenolytisch unter Einsatz von Pd- und Ni-Katalysatoren erreicht wurde.^[34] Diese heterogene Reaktionsführung war jedoch mit einer Reihe funktioneller Gruppen, wie Thiazolidin-geschützte Cystein-Reste, inkompatibel und wurde durch die Einführung der metallfreien radikalischen Entschwefelung abgelöst.^[35] Dabei wird durch Einsatz des Radikalstarters 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]dihydrochlorid (VA-044) zunächst das Thiyl-Radikal gebildet, welches nachfolgend mit Tris-(2-carboxyethyl)-phospin (TCEP) zum Kohlenstoff-zentrierten Radikal reagiert. Durch Anwesenheit eines geeigneten Hydrid-Donors, meist *tert*-Butylmercaptan oder Glutathion, bildet sich das entschwefelte Zielpeptid. Der Forschungsleistung verschiedener Arbeitsgruppen ist es zu verdanken, dass die Ligations-Entschwefelungs-Strategie heutzutage auf 13 der 19 möglichen proteinogenen Aminosäuren angewendet werden kann (Abbildung 3C).^[36] Jedoch ist die Synthese der benötigten Thiol-modifizierten SPPS-kompatiblen Monomere mit einem erheblichen

synthetischen Arbeitsaufwand verbunden und die Ligations-Entschwefelungs-Strategie nicht vollständig frei von Nebenreaktionen^[36b] (beispielsweise Additions-^[36k] oder Eliminierungsreaktionen^[36h]). Außerdem verhindern die als NCL-Katalysatoren eingesetzten Thiol-Additive oftmals eine direkte Entschwefelung des Ligationproduktes^[37] und müssen aus diesem Grund mittels HPLC-Reinigung oder durch Anwendung spezieller Extraktionsverfahren^[36k, 38] entfernt werden. Eine elegante Lösung dieses Problems wurde von der Arbeitsgruppe *Payne*, durch die Verwendung von Trifluoethanthiol, entwickelt. Dieses Thiol-Additiv kann nach der Peptidligation aufgrund seines niedrigen Siedepunktes (37°C) durch einfaches Einleiten von Argon aus der Reaktionslösung entfernt und dadurch die Ligation-Entschwefelungs-Prozedur im Eintopf-Format durchgeführt werden. Zusätzlich ist Trifluoethanthiol

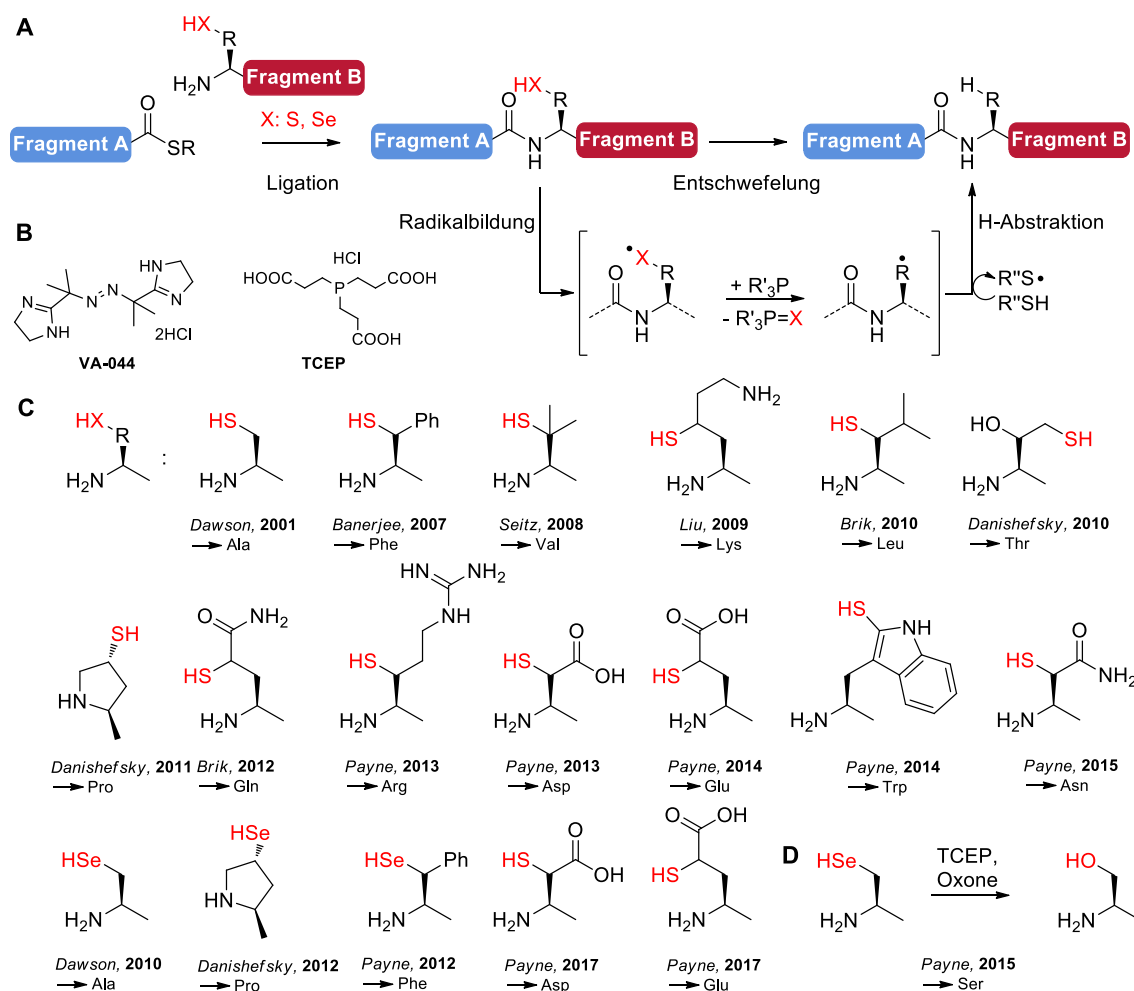


Abbildung 3: ENCL mit anschließender Entschwefelung (X = S) oder Deselenierung (X = Se): Die Reaktion des Peptidthioesters mit dem Thiol- oder Selen-modifizierten C-terminalen Fragment ergibt das Amid-verknüpfte Ligationprodukt. Mittels metallfreier radikalischer Entschwefelung/Deselenierung wird im nächsten Schritt das native Peptid erhalten (A). Chemische Struktur des Radikalstarters VA-044 und des Trialkylphosphins TCEP (B). Auswahl N-terminaler Thiol- und Selenol-modifizierter Reste für die ENCL und den daraus zugänglichen Aminosäuren an der Ligationstelle (C). Oxidative Deselenierung von Selenocystein-Resten zu Serin (D).

einähnlich leistungsfähiger NCL-Katalysator wie MPAA.^[39] In diesem Zusammenhang ist auch der Einsatz des günstigen und effizienten NCL-Katalysators α -Mercaptoessigsäuremethylester erwähnenswert, welcher ohne Probleme für Ligations-Entschwefelungs-Prozeduren im Eintopf-Format verwendet werden kann – ohne entfernt werden zu müssen.^[40] Erst kürzlich wurde von *Yoshiya et al.* die Verwendung von Imidazol als erstes nicht-Thiol-basiertes NCL-Additiv vorgestellt, welches ebenfalls mit nachfolgenden Entschwefelungsreaktionen vollständig kompatibel ist.^[41] Ein weiteres Problem der Ligations-Entschwefelungs-Strategie besteht darin, dass interne Cystein-Reste durch Einsatz geeigneter Schutzgruppen während der Entschwefelungsreaktion maskiert und anschließend wieder deblockiert werden müssen. Diese zusätzlichen Arbeitsschritte sind umständlich, zeitaufwändig und verringern die Ausbeute der Synthese. Nur der Einsatz von β -Thio-Asparaginsäure-Resten ermöglicht die selektive Entschwefelung in Anwesenheit ungeschützter Cystein-Reste.^[36] Eine andere Möglichkeit besteht darin, Selen-modifizierte Aminosäuren zu verwenden (Abbildung 3; X = Se). Die Verknüpfungsreaktionen verlaufen hierbei analog zur NCL/ENCL. Jedoch erfolgt, laut *Raines et al.*, die Peptidligation aufgrund der höheren Nukleophilie des Alkylselenols (bzw. dessen kleineren pK_s -Wertes: Selenocystein~5.4; Cystein~8.5)^[42] deutlich rascher (pH 5.0: Faktor 10^3 ; pH 7.0: Faktor 10^2) und sind auch bei niedrigen pH-Wert (pH ≥ 4) möglich.^[43] Darüber hinaus können die Ligations-vermittelnden Selen-Einheiten selektiv in Gegenwart ungeschützter Cystein-Reste entfernt werden („Deselenierung“).^[44] Kürzlich wurde die oxidative Deselenierung beschrieben wobei ein Selenocystein-Rest nach der Ligation in Serin überführt wird (Abbildung 3D).^[45] In Anbetracht dieser Vorteile ist es verwunderlich, dass bisher nur drei SPPS-kompatible Selenol-Monomere in der Literatur beschrieben sind. Ein möglicher Grund für diesen Sachverhalt ist die ausgeprägte Tendenz der Alkylselenole zur Bildung von Diseleniden oder gemischten S-Se-Verbindungen (mit internen Cystein-Resten oder Thiol-Additiven), wodurch eine Aufreinigung des komplexen Produktgemisches erschwert wird.^[44a, 44b] Des Weiteren muss nach kritischer Betrachtung der verfügbaren Selen-basierten ENCL-Methoden festgestellt werden, dass die Reaktionen wohl deutlich langsamer verlaufen als ursprünglich von *Raines et al.*^[43] berichtet wurde. Die Geschwindigkeit der Selenol-basierten Verknüpfungsreaktionen scheint durch die Spaltung der Diselenid-Bindung bestimmt zu werden. Das effiziente Reduktionsmittel TCEP kann aufgrund der schwachen Se-C-Bindung und der daraus resultierenden raschen, unerwünschten Deselenierung des Startmaterials jedoch nicht

verwendet werden. Durch Einsatz von MPAA verläuft die Reduktion der Diselenid-Bindung zwar äußerst langsam (Ligationszeiten von 24 h-96 h), jedoch umgeht diese Variante das Problem der frühzeitigen Deselenierung.^[42a, 44a, 44b] Erst durch die Entdeckung der Selenoester-Selenocystein-Ligation im Jahre 2015 konnte eine erhebliche Verbesserung dieser ENCL-Methode erreicht werden. Durch die Verwendung von α -Peptidselenoestern verlaufen die Verknüpfungsreaktionen mit Selenocysteinylopeptiden in wenigen Minuten (1-10 min) und benötigen keine Thioladditive oder Reduktionsmittel im Reaktionspuffer.^[46] Das Konzept dieser effizienten Verknüpfungsmethode wurde erst kürzlich durch den Einsatz von α -Selenol-Asparginsäure- und β -Selenol-Glutaminsäure-Resten erweitert. Durch die benachbarte Carbonyl-Funktion wird die C-Se-Bindung an diesen modifizierten Aminosäuren geschwächt, wodurch die Selenol-Gruppen selektiv in Gegenwart von ungeschützten Selenocystein-Resten entfernt werden.^[47]

Zusammenfassend konnte durch die Ligations-Entschwefelungs/Deselenierungs-Strategie die Reichweite der NCL deutlich erweitert werden. Jedoch ist die Synthese der individuellen SPPS-kompatiblen Monomere ein entscheidender Nachteil dieser Methode und vermutlich der Grund, weshalb deren Anwendung auf wenige spezialisierte Peptidsynthese-Arbeitsgruppen limitiert ist.

Eine ENCL-Strategie, welche theoretisch nur eine einzige Hilfsverbindung (Auxiliar) benötigt, um das gesamte Spektrum aller Ligationsstellen abzudecken, ist die sogenannte Auxiliar-vermittelte Peptidligation (Abbildung 4A). Dabei ermöglicht ein Thiol-modifiziertes Auxiliar, welches an der α -Aminofunktion des C-terminalen Fragments positioniert ist, zunächst die Thiol-Austauschreaktion mit dem Peptidthioester. Im Gegensatz zur NCL ist am nachfolgenden S \rightarrow N-Acyltransfer ein sekundäres Amin beteiligt und führt zur Bildung der tertiär Amid-verknüpften Ligationsproduktes. Anschließend muss das Auxiliar entfernt werden, um das native Peptid oder Protein zu erhalten. Das Konzept der N $^{\alpha}$ -Auxiliare wurde erstmal 1996 von Kent *et al.* durch Verwendung des 2-Mercaptoethyl-Auxiliars (Abbildung 4B) vorgestellt, welches Ligationen über einen günstigen 5-gliedrigen Übergangszustand vermittelt, jedoch anschließend nicht vom Peptidrückgrat des Ligationsproduktes abgelöst werden konnte. Im Gegensatz dazu ermöglichte das reduktiv abspaltbare 2-Mercaptoethoxy-Auxiliar erstmals den Zugang zu nativen Peptiden durch Einsatz eines N $^{\alpha}$ -Auxiliars. Allerdings erfolgt in diesem Fall der S \rightarrow N-Acyltransfer über einen ungünstigen 6-gliedrigen

Übergangszustand, weshalb die Verknüpfungsreaktionen deutlich langsamer als im Vergleich zur Mercaptoethyl-Struktur, verlaufen.^[8] Beiden Auxiliaren ist gemein, dass sie auf einen Glycin-Rest an der Ligationstelle angewiesen sind, wodurch der präparative Nutzen dieser ENCL-Werkzeuge stark eingeschränkt ist. Die weitere Entwicklung der N^{α} -Auxiliare konzentrierte sich auf zwei unterschiedliche N-Benzyl-Strukturen: Im Fall der 2-Mercaptobenzyl-Auxiliare (Abbildung 4C) durchläuft der $S \rightarrow N$ -Acytransfer einen 6-gliedrigen Übergangszustand, der aufgrund des beteiligten Arylsystems wenig Flexibilität besitzt. Die elektronischen Eigenschaften der aromatischen Substituenten bestimmen, ob das Auxiliar acidolytisch, im Fall elektronenschiebender Substituenten, oder photolytisch, durch Verwendung von *ortho*-Nitro-Benzyl-Grundgerüsten, entfernt wird.^[48] Auch die Labilität der 1-Phenyl-2-mercaptoethyl-basierten Auxiliare (Abbildung 4D) wird durch geeignete Wahl und Positionierung der Substituenten bestimmt. Jedoch vermittelt diese Gruppe der N^{α} -

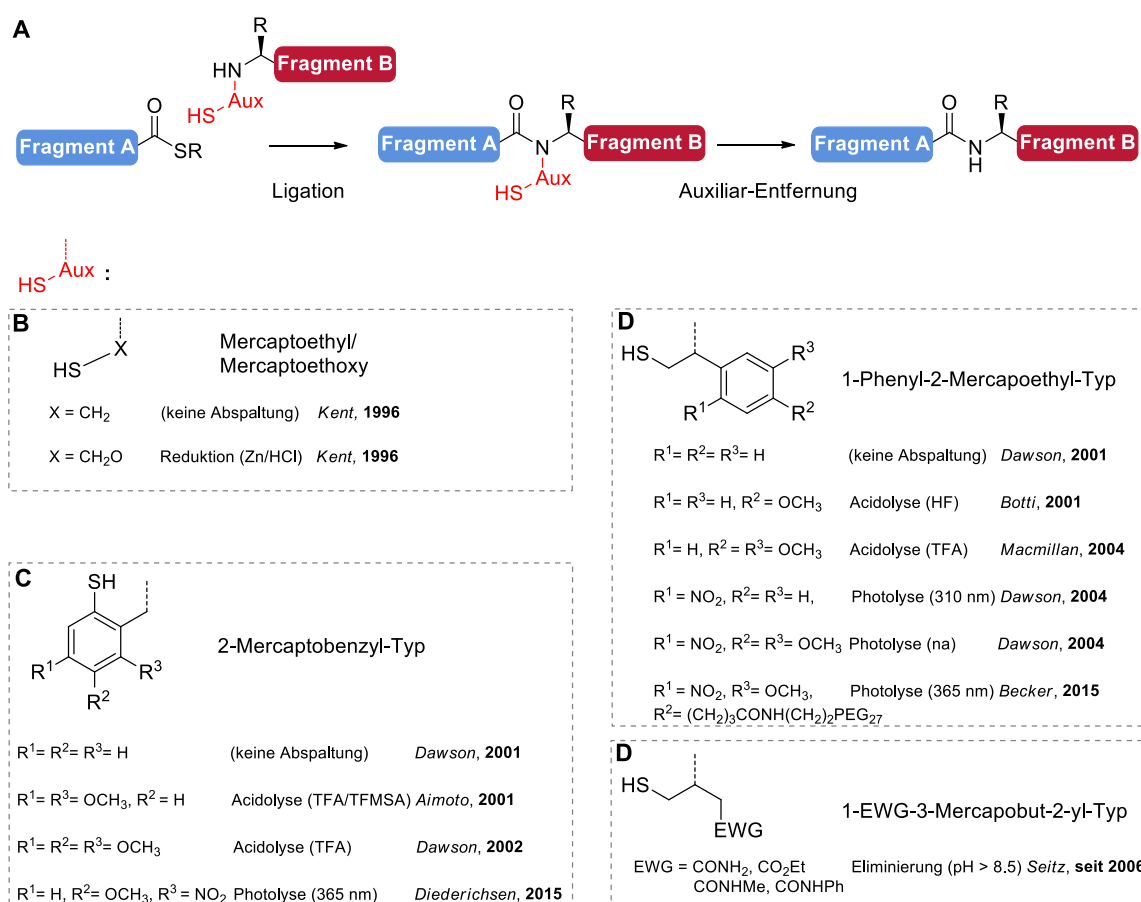


Abbildung 4: Auxiliar-vermittelte Peptidligation: Die Reaktion des Peptidthioesters mit dem Thiol-funktionalisierten Auxiliarpeptid ergibt das tertiär Amid-verknüpfte Ligationsprodukt. Durch anschließende Entfernung des Auxiliars wird das native Peptid erhalten (A). Chemische Strukturen bekannter N^{α} -Auxiliare und Bedingungen zu deren Entfernung im Anschluss an die Peptidligation (B-E). na: nicht angegeben.

Auxiliare den S→N-Acyltransfer über einen 5-gliedrigen Übergangszustand.^[49] Trotz der Ligationsstellen begrenzt.^[9] Zusätzlich ist die Spaltung der aufgebauten Amidbindung während der acidolytischen Auxiliarentfernung eine bekannte Nebenreaktion, welche nur durch weitere aufwendige chemische Modifizierung des Ligationsproduktes (S-Alkylierung) unterbunden werden kann.^[50] Vermutlich aus diesem Grund konzentrierten sich aktuelle Arbeiten auf den photolabilen Varianten der N^α-Auxiliare. Eine weitere Möglichkeit die stark sauren Abspaltbedingungen zu umgehen, ist die Verwendung von basenlabilen Auxiliaren, welche seit 2004 im Arbeitskreis Seitz entwickelt werden. Die Grundlagen dieses Forschungsvorhabens wurden während der Promotion (2004-2010) von Dr. Christian Haase^[51] erarbeitet und seit dem Jahre 2010 von Dr. Ziv Harpaz^[52] weiter vorangetrieben. Dabei konnten vier Auxiliare identifiziert werden, welche unter basischen Bedingungen (pH 8.5 – 10) bei erhöhter Tempertur (50-80°C) erfolgreich entfernt wurden (vorgeschlagener Mechanismus, siehe Abbildung 8 und Harpaz *et al.*^[53]). Allerdings sind auch diese Hilfsmoleküle auf einen Glycin-Rest an der Verknüpfungsstelle angewiesen. Ein weiteres Problem der „basenlabilen“ Auxiliare ist deren Tendenz zur Thiolacton-Bildung. Dabei erfolgt ein intramolekularer Angriff der Thiol-Funktion des Auxiliars an der δ-ständigen Carbonylgruppe der elektronenziehenden Gruppe (EWG) unter Ausbildung eines stabilen 5-gliedrigen Thiolactons. Diese intramolekulare Reaktion erfolgt meist rasch und überführt das Auxiliarpeptid in eine für die Peptidligation inaktive Form, wodurch die Ausbeute der Verknüpfungsreaktion teils erheblich verringert wird.^[52]

Neben dem Einsatz von Auxiliaren an der α-Aminofunktion des C-terminalen Peptidfragments wurde ebenfalls deren Verwendung in den Seitenketten erfolgreich demonstriert. Im Fall der Zucker-vermittelten Peptidligation (SAL, „sugar-assisted ligation“, Abbildung 5A) werden die Seitenketten von Serin, Threonin oder Asparagin mit Thiol-modifizierten Zucker-Einheiten versehen, welche die Ligation mit den Peptidthioestern ermöglichen. Nach der Verknüpfungsreaktion werden die Thiol-Funktionen entweder durch Anwendung der metallfreien Entschwefelung oder durch Aminolyse des α-Mercaptoessigsäureesters entfernt und so das unmodifizierte Glykoprotein erhalten. Bemerkenswert ist, dass die Zucker-basierten Auxiliare nicht zwangsläufig an der N-terminalen Aminosäure vorhanden sein müssen, sondern auch aus internen Positionen effizient die Verknüpfungsreaktionen am N-Terminus ermöglichen.^[54] Allerdings ist die SAL-Strategie auf Glykoproteine beschränkt und

die Synthese der benötigten Thiozucker-Auxiliare anspruchsvoll. Das von *Brik et al.* entwickelte Cyclohexyl-basierte Seitenketten-Auxiliar sollte diese beiden Nachteile beheben, indem das synthetisch leicht zugängliche Auxiliar nach erfolgter Ligation durch basische Hydrolyse des Esters wird (Abbildung 5B).^[55] Die Anwendung des Konzeptes konnte erfolgreich an Modellpeptiden demonstriert werden – jedoch versagte die Methode bei der Synthese des HIV-Tat Proteins, da die Abspaltung des Cyclohexyl-Auxiliars im letzten Schritt nicht erreicht werden konnte.^[56] Neben den genannten Methoden wurden außerdem Phosphat^[57]- und Mercaptomethyl^[58]-Gruppen für die ENCL an Ser- und Thr-Resten erprobt. In beiden Fällen verlaufen die Verknüpfungsreaktionen eher langsam und müssen in organischen Lösungsmittel erfolgen, um die vorzeitige Hydrolyse des Phosphorsäureesters bzw. des Thiohemiacetals zu verhindern. Erst kürzlich wurde von *Liu et al.* ein neuer Ansatz zur dualen Verwendung des säurelabilen Trimethoxybenzyl-Auxiliars präsentiert (Abbildung

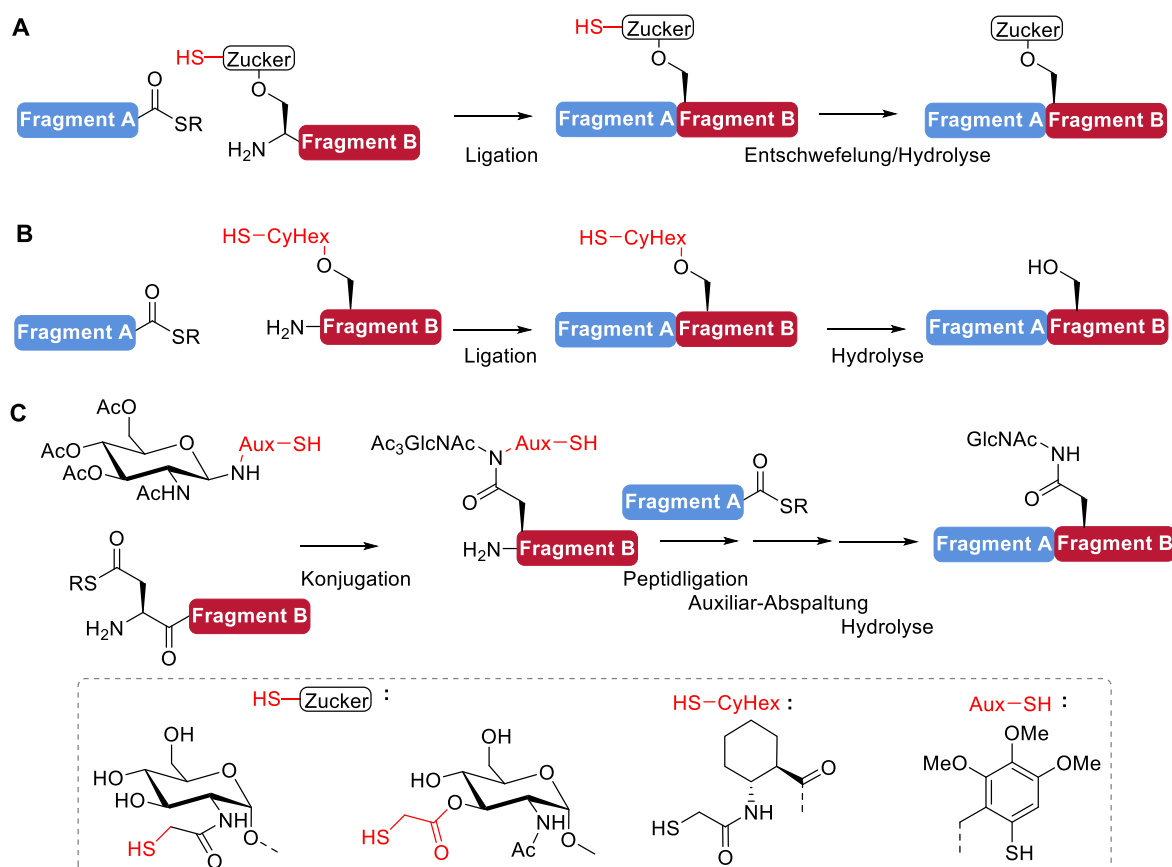


Abbildung 5: Seitenketten-Auxiliare in der ENCL: In der Zucker-vermittelten Peptidligation erfolgt die Fragmentverknüpfung durch Einsatz Thiol-modifizierter Zuckerreste in den Seitenketten des C-terminalen Fragments. Die gewünschten Glykoproteine werden nach Entfernung der Mercapto-Funktion/Linker erhalten (A). ENCL durch Einsatz des Cyclohexyl-basierten Seitenketten-Auxiliars, welches durch Hydrolyse vom Ligationsprodukt entfernt wird (B). Duale NCL-Strategie zum Aufbau von N-glykosidisch gebundener Glykoproteine an Asparaginsäure (C): Das Trimethoxybenzyl-Auxiliar vermittelt zuerst die Verknüpfung des Zucker-Restes an der Asparaginsäure-Seitenkette und anschließend die N-terminale Peptidligation mit dem C-terminalen Peptidthioester. Nach acidolytischer Entfernung des Auxiliars und Hydrolyse der Acetyl-Schutzgruppen wird schließlich das gewünschte N-verknüpfte Glykoprotein erhalten.

5C). Hierbei werden N-terminale Asparaginsäurethioester-Peptidfragmente in einer ersten Reaktion mit dem Auxiliar-Zucker-Konjugat in der Seitenkette verknüpft und anschließend mit einem C-terminalen Peptidthioester umgesetzt, wobei in diesem Schritt der Acyltransfer auf die α -Aminogruppe erfolgt. Im letzten Schritt wird das Auxiliar acidolytisch entfernt und nach basischer Hydrolyse der Acetyl-Schutzgruppen das gewünschte Glykoprotein erhalten.^[59]

Neben den bisher vorgestellten ENCL-Methoden, welche ausschließlich über S-S-Thiolaustausch und anschließendem S \rightarrow N-Acyltransfer verlaufen, wurde auch eine Vielzahl anderer Reaktionstypen für die chemoselektive Verknüpfung geschützter/ungeschützter Peptidfragmente erprobt (siehe Übersichtsartikel^[29]). Ein bekanntes Beispiel ist die „spurlose Staudinger-Ligation“ bei der N $^{\alpha}$ -Azid-Peptidfragmente mit C-terminalen Peptid(phosphin)-thioestern umgesetzt werden (Abbildung 6A). Entsprechend der Staudinger-Reaktion bildet sich, unter Freisetzung von Stickstoff das Aza-Ylid-/ Iminophosphoran-Intermediat, welches durch nachfolgenden intramolekularen S \rightarrow N-Acyltransfer und Hydrolyse in das Amid-verknüpfte Ligationsprodukt überführt wird.^[60] Im Vergleich zu anderen ENCL-Methoden findet die spurlose Staudinger-Ligation wenig Anwendung in der chemischen Totalsynthese von Proteinen.^[61] Dieser Umstand ist vermutlich auf verschiedene Ursachen, wie beispielsweise dem umfangreichen synthetischen Aufwand zur Darstellung der Phosphinothioester bzw. α -Azido-Aminosäuren und den speziellen Ligationsbedingungen (Schutzgas-Atmosphäre, Zusätze organischer Lösungsmittel), zurückzuführen. Die Reaktionsführung in wässrigen Puffer-Systemen konnte erst durch Entwicklung eines wasserlöslichen Dimethylamino-funktionalisierten Phosphinthiols ermöglicht werden.^[62] Die von *Bode et al.* entwickelte KAHA-Ligation basiert auf der chemoselektiven Reaktion von α -Keto-carbonsäuren und Hydroxylaminen, welche sich jeweils an C-bzw. N-Terminus der Peptidfragmente befinden (Abbildung 6B).^[63] Durch ^{18}O -Isotopenmarkierung wurde festgestellt, dass der Sauerstoff des Hydroxylamins nach der Verknüpfungsreaktion in der aufgebauten Amidbindung vorliegt. Der daraus abgeleitete Reaktionsmechanismus („Typ-1“) beinhaltet zunächst die Bildung eines Halbaminals, welches nach Abspaltung von Wasser in das entsprechende Nitron überführt wird. Die nachfolgende intramolekulare Reaktionskaskade ergibt das Oxaziridin-Intermediat und schließlich das Amid-verknüpfte Ligationsprodukt unter Freisetzung von CO_2 .^[64] Aufgrund der langsamen Verknüpfungs-

reaktionen in Gegenwart von Wasser musste die KAHA-Ligation zu Beginn in organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden. Dies führte jedoch häufig zu Löslichkeitsproblemen, im Fall mittelgroßer Peptidfragmente, oder zur Bildung von Nebenprodukten, wie der Oxidation von Methionin- oder Cystein-Resten durch Dimethylsulfoxid.^[65] Erst die Entwicklung der *O*-Benzylhydroxyl-amin- und 5-Oxaprolin-vermittelten KAHA-Ligation ermöglichte die Reaktionsführung in wässrigen Puffersystemen. Der Einsatz dieser beiden Varianten ist allerdings aufgrund von Eliminierungsreaktionen oder dem verbleibenden unnatürlichem Homoserin-Rest an der Ligationstelle nur eingeschränkt möglich.^[66] Zusätzlich erfordert die KAHA-Ligation die Verwendung spezieller SPPS-Bausteine zur Darstellung der benötigten Peptidfragmente und ist im Vergleich zur NCL deutlich langsamer, obwohl die Peptidfragmente für gewöhnlich bei höheren Konzentrationen (10–20 mM) und Temperaturen (50–60°C) umgesetzt werden.^[67] Trotz dieser Hindernisse wurde das Potential der KAHA-Ligation mehrfach anhand anspruchsvoller Protein-Synthesen demonstriert.^[65] In einer aktuellen Arbeit von *Arora et al.* wurde eine besonders leistungsfähige Methode zur Verknüpfung kurzer Peptidfragmente vorgestellt (Abbildung 6C). Die Strategie

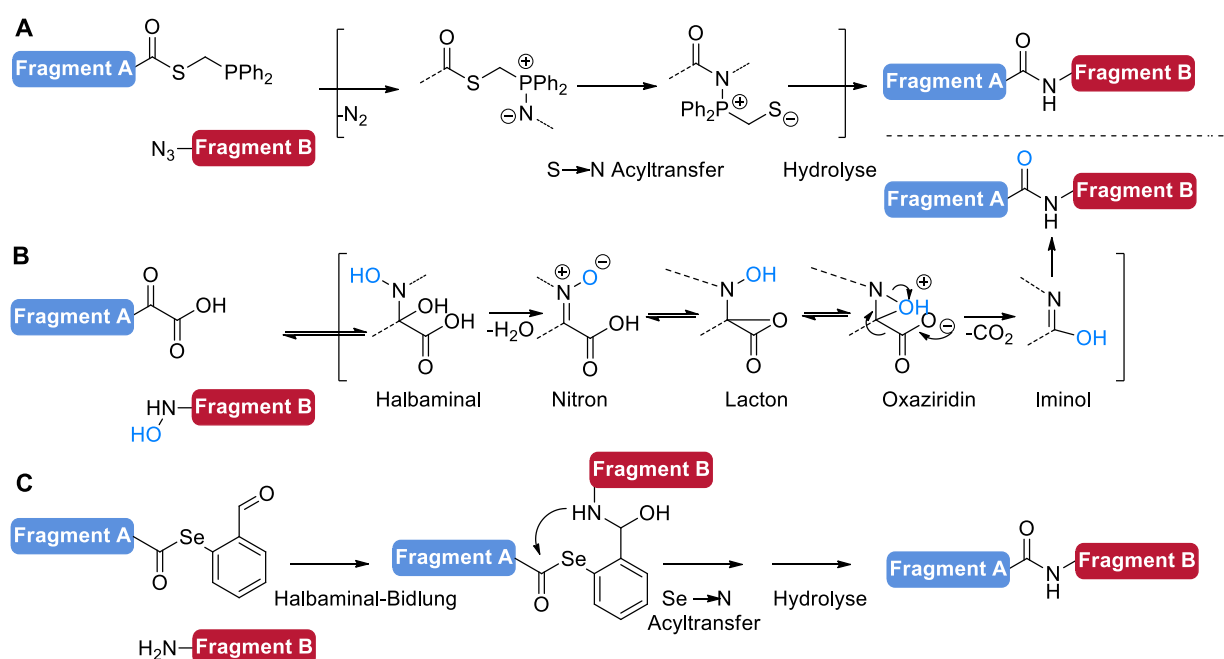


Abbildung 6: Konzepte und mechanistische Aspekte ausgewählter ENCL-Methoden: Die spurlose Staudinger-Ligation ermöglicht den Zugang zu Amid-verknüpften Ligationsprodukten durch Einsatz von Phosphinothioestern und α -Azido-modifizierten Peptidfragmenten (A). Die KAHA-Ligation nutzt die chemoselektive Reaktion C-terminaler Peptidketo-carbonsäuren und N ^{α} -Hydroxylamin-tragender Peptidfragmente zum Aufbau nativer Proteinstrukturen (B). Verwendung des ortho-Benzaldehydselenoester-Auxiliars im Sinne der „aldehyde-capture“-Methode (C). Um ungewünschte Ligation in den Lysin-Seitenketten zu vermeiden muss die Chemoselektivität dieser Reaktion durch geeignete Reaktionsbedingungen auf die N-terminale α -Amino-Funktion eingestellt werden.

basiert auf dem Einsatz Aldehyd-funktionalisierter Peptidselenoester, welche im ersten Schritt mit der α -Amino-Gruppe des C-terminalen Fragments, unter Ausbildung des Imin-verknüpften Intermediates, reagieren. Durch nachfolgenden Se \rightarrow N-Acyltransfer und Hydrolyse des Halbaminals wird das Amid-verknüpfte Ligationsprodukt erhalten.^[68] Ähnliche Konzepte (sogenannte „aldehyde-capture“-Methoden) wurden zwar schon zuvor für Acyltransfer- oder Peptidfragmentverknüpfungs-Reaktionen verwendet, jedoch ermöglichte erst die Verwendung des *ortho*-Benzaldehydselenoester-Auxiliars die Verknüpfung an nahezu jeder beliebigen Ligationsstelle.^[69] Ein mögliches Problem dieser Methode ist die notwendige chemoselektive Reaktion der α -Amino-Gruppe in Gegenwart ungeschützter Lysin-Reste. Die Autoren vermuteten, dass aufgrund der unterschiedlichen pKs-Werte der beiden Aminofunktionen eine selektive Ligation am N-Terminus durch Verwendung eines geeigneten pH-Wertes (pH = 7) erreicht werden kann. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurde ein fluoreszierender Benzaldehydselenoester mit Ubiquitin (beinhaltet sieben Lysin-Reste) umgesetzt. Mit Hilfe von MS/MS-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Reaktion nur an der gewünschten N-terminalen Position erfolgt.^[68] Die Anwendung dieser Methode wurde bisher nur an kurzen Modellpeptiden (in organischen Lösungsmittel) gezeigt und muss daher noch dessen Fähigkeit zur Verknüpfung großer ungeschützter Peptidfragmente (im wässrigen Medium) unter Beweis stellen. Im Ubiquitin-Kontrollexperiment wurde durch Einsatz des fluoreszierenden Benzaldehydselenoester im Überschuss nur ein Umsatz von 70% nach 40 h erreicht. Dieser geringe Umsatz deutet auf eine geringe Effizienz des *ortho*-Benzaldehydselenoester-Auxiliars hin, sobald die Verknüpfungsreaktionen an realen Proteinstrukturen und in wässrigen Puffern erfolgt.

Zusammenfassend konnte durch die Entwicklung unterschiedlicher chemoselektiver Peptidfragment-Verknüpfungsmethoden das Repertoire der NCL deutlich erweitert werden. Die vorgestellten Methoden unterliegen jedoch individuellen Einschränkungen und benötigen in den meisten Fällen den Einsatz nicht kommerziell-verfügbarer Bausteine. Bis zum heutigen Tage ist keine universell anwendbare Methode zur cysteinfreien Peptidligation bekannt.

2.2.3. Peptidligation auf der festen Phase

Wie bereits erwähnt, kann die Verknüpfung von Peptidfragmenten auch auf einer festen Phase erfolgen. Das Konzept der sogenannten „*solid phase chemical ligation*“ wurde erstmals von *Kent et al.* vorgestellt. Im ersten Schritt dieser Verknüpfungsstrategie wird ein ungeschütztes Peptidfragment (Abbildung 7) kovalent mit einem polymeren Träger verknüpft („Immobilisierung“) und durch Zugabe eines weiteren, ungeschützten Peptidfragments, per NCL oder ENCL, zur Reaktion gebracht. Anschließend wird die verbleibende Reaktionslösung per Filtration und nachfolgenden Waschschritten restlos aus dem polymeren Träger entfernt. Nach Spaltung der kovalenten Verknüpfung zwischen Zielprotein und der festen Phase erfolgt im letzten Schritt die Freisetzung („Elution“) des Ligationsproduktes aus dem polymeren Trägermaterial. Wie *Kent* bereits in seiner wegweisenden Arbeit zeigen konnte, ist diese Strategie nicht nur auf eine einzelne NCL-Reaktion beschränkt, sondern auch auf mehrere, nacheinander folgenden Verknüpfungsreaktionen anwendbar („sequentielle SPCL“). Analog zur SPPS, erleichtert dabei die feste Verankerung der wachsenden Peptidkette mit dem polymeren Träger die Durchführung intermediärer Reinigungsschritte erheblich. Erfolgt der schrittweise Aufbau des Zielproteins in N→C-Richtung (Abbildung 7A) wird zuerst das N-terminale Peptidfragment als Peptidthioester immobilisiert und anschließend mit einem Cysteinyl-Peptidfragment, welches zusätzlich über eine C-terminale maskierte Thioesterfunktion verfügt, umgesetzt. Nach der Ligation erfolgt die Generierung des C-terminalen Peptidthioesters am Harz-gebundenen Volllängenpeptid, wodurch eine zweite Verknüpfungsreaktion mit einem dritten Peptidfragment ermöglicht wird. Anschließend können die beschriebenen Elementarschritte (Ligation und Thioester-Generierung) der N→C-gerichteten, sequentiellen SPCL bis zum vollständigen Aufbau des Zielproteins wiederholt werden. Durch den Einsatz von Peptidthiosäure-Salzen, als maskierte Thioester-Vorstufen, konnte *Kent et al.* bereits im Jahre 1999 die sequentielle Verknüpfung dreier Peptidfragmente auf der festen Phase demonstrieren (Abbildung 7B). Die notwendigen Peptidthioester wurden dabei durch selektive Alkylierung der Thiocarbonsäure-Funktion im Zuge der SPCL erhalten. Um die NCL-Reaktionen im wässrigen Reaktionsmedium zu ermöglichen, erfolgte die SPCL auf einem Zellulose-basierten polymeren Träger.^[70] Die N→C-gerichtete sequentielle SPCL besitzt jedoch zwei Schwachstellen: Einerseits besteht die Gefahr der Hydrolyse des Harz-gebundenen Peptidthioesters während der Verknüpfungsreaktion, wodurch keine Verlängerung des Peptidfragments mehr stattfinden kann. Andererseits erscheint die Verfüg-

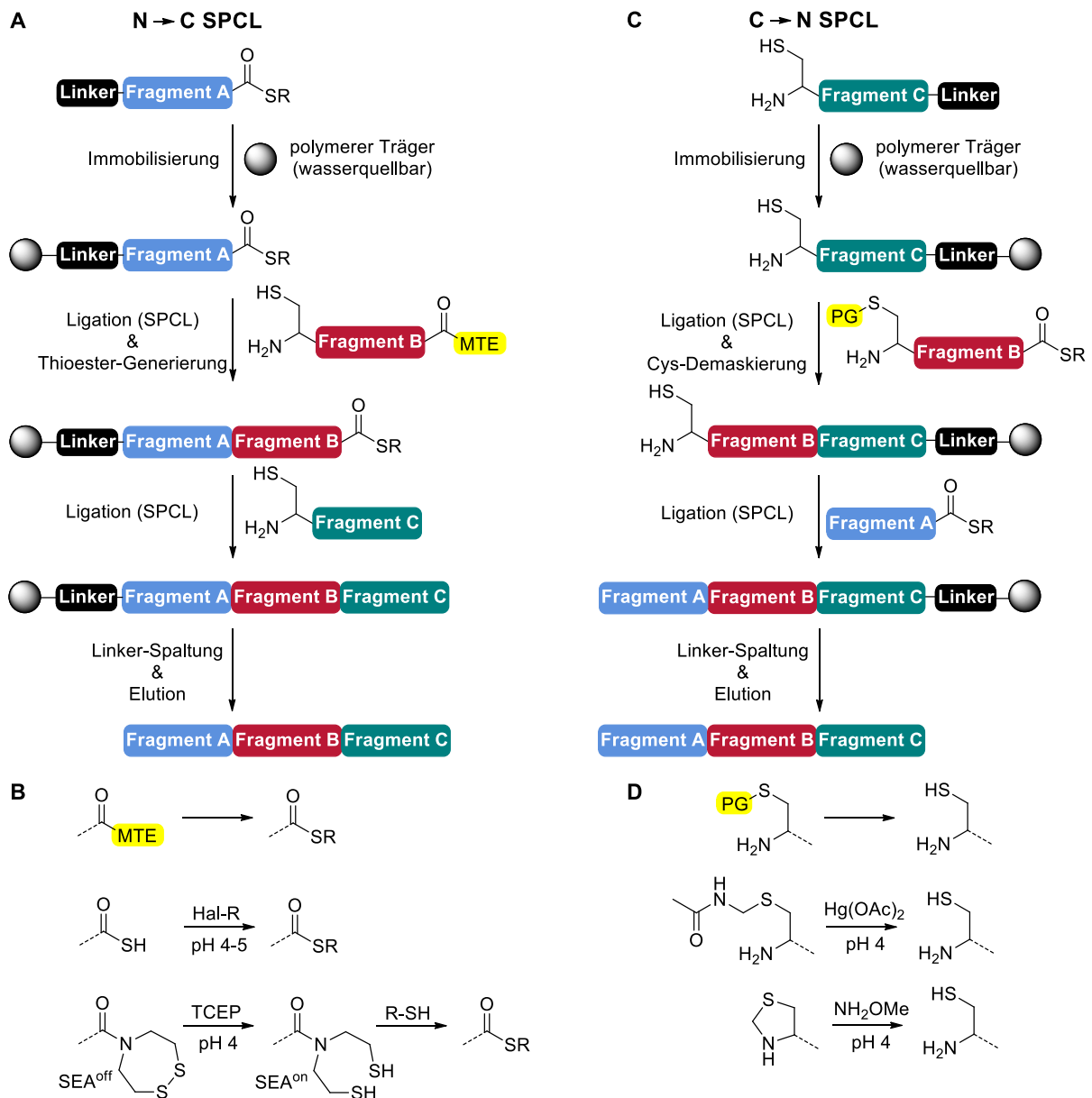


Abbildung 7: Konzept der N→C- und C→N-gerichteten SPCL (A/C). Als maskierter Peptidthioester (MTE) finden Peptid-säuren und SEA-Amide Anwendung in der sequentiellen SPCL (B). Zur temporären Maskierung N-terminaler Cystein-Reste können AcM-Schutzgruppen oder Thiazolidin-Einheiten verwendet werden (D).

barkeit von SPCL-kompatiblen, temporär maskierten Peptidthioestern problematisch. Neben den Peptidthiosäure-Salzen konnten bisher nur der Einsatz von Bis(2-sulfanylethyl)amino (SEA)-Peptidfragmenten als nützliche maskierte Thioester-Vorstufen in der sequentiellen SPCL demonstriert werden (Abbildung 7B). In Form des zyklischen Disulfids liegt die SEA-Einheit in seiner maskierten, inaktiven Form („SEA^{off}“) vor (Abbildung 7B). Erst in Gegenwart ausreichend starker Reduktionsmittel (beispielsweise TCEP) wird die Disulfidbindung gespalten („SEA^{on}“). Durch nachfolgenden N→S-Acyltransfer und anschließender Thiolyse bildet sich der gewünschte Peptidthioester. Die Verwendung der SEA^{off}/SEA^{on}-Strategie

ermöglichte bereits vier sequentielle Verknüpfungsreaktionen auf der festen Phase.^[71] Ein anderer Ansatz besteht darin die sequentielle SPCL in C→N-Richtung durchzuführen (Abbildung 7C). Dabei wird das N-terminale Cystein-Peptidfragment über dessen C-Terminus auf dem polymeren Träger immobilisiert und anschließend mit einem Peptidthioester, welcher am N-Terminus einen maskierten Cysteinrest besitzt, zur NCL-Reaktion gebracht. Im Anschluss an die erste Ligation erfolgt die Entfernung der N-terminalen Cystein-Schutzgruppe, wodurch das Harz-gebundene Ligationsprodukt für eine weitere Verknüpfungsreaktion zur Verfügung steht. Anschließend wiederholt sich die Reaktionführung bestehend aus Ligation und Deblockierung des N-terminalen Cystein-Restes bis zum vollständigen Aufbau des Zielproteins. Als temporäre Cystein-Schutzgruppen wurden bisher S-Acetamidomethyl-Ether (Acm)^[70, 72] und N-terminale Thiazolidin-Reste (Thz)^[73] verwendet (Abbildung 7D). Diese Auswahl etablierter Cystein-Schutzgruppen ermöglichte bis zu vier sequentielle SPCL-Reaktionen auf Cellulose^[70]-oder PEGA^[73]-basierten polymeren Trägern. Dennoch wird die SPCL vergleichsweise selten in der chemischen Proteinsynthese genutzt, was vermutlich auf den erhöhten Arbeitsaufwand (Synthese der Linkermoleküle, Modifizierung der polymeren Träger, etc.) zurückzuführen ist.

3. Zielstellung

Chemoselektive Peptidfragment-Verknüpfungsmethoden bilden ein zentrales Element der modernen chemischen Proteinsynthese. Die aktuell verfügbaren Methoden sind jedoch in ihrem Anwendungsbereich beschränkt. Im Fall der leistungsfähigen nativen chemischen Peptidligation können nur cysteinhaltige Ligationsstellen adressiert werden, welche besonders selten in Proteinen zu finden sind.^[7, 32] Die intensive Forschungsleistung auf dem Gebiet der Ligations-Entschwefelungsstrategie ermöglicht heutzutage die erweiterte Peptidligation an einer Vielzahl von Verknüpfungstellen jenseits von Cystein. Allerdings können nur vier der 13 benötigten SPPS-kompatiblen Thioamino-säure-Monomere durch Einsatz kommerzieller Bausteine oder Reagenzien im Zuge der SPPS eingeführt werden.^[36m] Allein die Auxiliar-vermittelte Peptidligation besitzt das Potential mit nur einem einzigen Hilfsmolekül alle beliebigen Ligationsstellen zu erschließen. Bisher beschriebene N^α -Auxiliare waren jedoch auf mindestens einen Glycin-Rest an der Verknüpfungsstelle angewiesen und deshalb stark in deren Anwendungsbereich eingeschränkt.^[9]

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von N^α -Auxiliaren, welche schnelle Ligationen - unabhängig von den an der Verknüpfungsstelle beteiligten Aminosäuren - erlauben und unter milden Bedingungen selektiv entfernt werden können. Die Einführung der Auxiliare sollte durch Einsatz geeigneter Vorläufer-Moleküle erfolgen, um die Peptidsynthese ausschließlich durch Verwendung kommerziell-verfügbarer Aminosäure-Bausteine zu ermöglichen und damit eine universelle und praktische Anwendung zu gewährleisten. Im Idealfall sollten die Reaktionsbedingungen zur Abspaltung der Auxiliare mit ungeschützten Cystein-Resten kompatibel sein.

Im ersten Teil der Promotion sollte das Konzept der Auxiliar-vermittelten Peptidligation durch die Einführung basenlabiler N^α -Auxiliare erweitert werden. Dazu sollten zwei mögliche Elektronenakzeptor-substituierte Auxiliarsysteme untersucht werden (Abbildung 8): In beiden Fällen ermöglicht die Mercaptofunktion des jeweiligen Auxiliars eine Thiolaustauschreaktion mit dem Peptidthioester, wodurch die C- und N-Termini beider Peptidfragmente in räumliche Nähe gebracht werden. Aus dem Thioesterintermediat verläuft der S \rightarrow N-Acyltransfer entweder über einen 6- oder 5-gliedrigen Übergangszustand unter Ausbildung der tertiären Amidbindung im Ligationsprodukt. Die elektronenziehenden Gruppen (EWG)

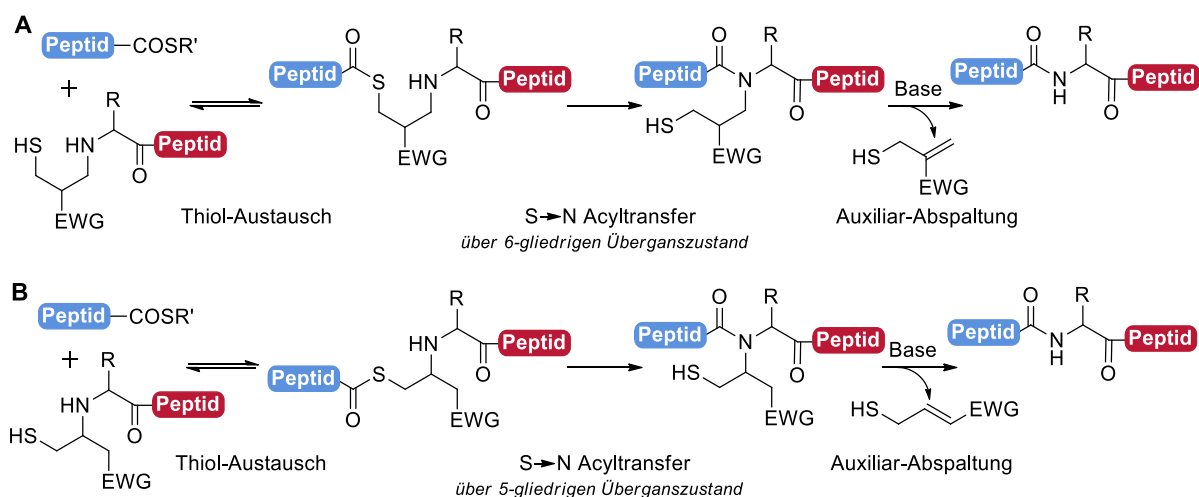


Abbildung 8: Konzept der basenlabilen-Auxiliare für die ENCL: Im ersten Schritt führt der Thiol-Austausch zur Bildung des Thioester-verknüpften Intermediates, welches durch anschließenden S→N-Acytransfer in das tertiär Amid-verknüpfte Ligationsprodukt überführt wird. Der Acyltransfer kann entweder über einen 6-(A) oder 5-gliedrigen (B) Übergangszustand verlaufen. Unter basischen Bedingungen werden die Auxiliare durch Deprotonierung des aciden, α-ständigen Wasserstoffatoms und der nachfolgender Eliminierungsreaktion entfernt.

erhöhen die C-H-Acidität des α-ständigen Wasserstoffatoms. Gleichzeitig wird im Verlauf der Peptidligation die zuvor N-terminale Aminofunktion in eine bessere Fluchtgruppe (Amid) überführt. Der vorliegenden Arbeitshypothese entsprechend, müssten diese beiden elektronischen Effekte eine Abspaltung des Auxiliars vom Ligationsprodukt durch Abstraktion des aciden Wasserstoffatoms und der nachfolgenden Eliminierungsreaktion ermöglichen. Neben den mild basischen Bedingungen zur Abspaltung sollten die beiden Auxiliär-Systeme, aufgrund ihrer flexiblen und unverzweigten α-Methylen-Gruppen, schnellere Peptidligationen als bisher beschriebene N-Benzyl-basierten Auxiliare ermöglichen.

Im Fokus des zweiten Teil dieser Arbeit stand die Entwicklung der 2'-substituierte 2-Mercaptoethyl-Auxiliare (Abbildung 9). Es wurde angenommen, dass die Verknüpfungsreaktionen an diesen Grundgerüsten besonders rasch verlaufen müssten, da der S→N-Acytransfer über einen 5-gliedrigen Übergangszustand erfolgt und gleichzeitig der sterische Anspruch des beteiligten sekundären Amins, aufgrund der fehlenden α-Verzweigung, bestmöglich reduziert wird. Die Ablösung der 2'-substituierten 2-Mercaptoethyl-Auxiliare sollte in Gegenwart von Trialkylphosphinen durch eine radikalische Entschwefelungsreaktion initiiert werden. Die dabei intermediär entstehenden Kohlenstoff-zentrierten Radikale würden durch anschließende β-Eliminierung und H-Abstraktion die gewünschten Amid-verknüpften Ligationsprodukte liefern. Erste Arbeiten zu diesem Thema sollten sich auf

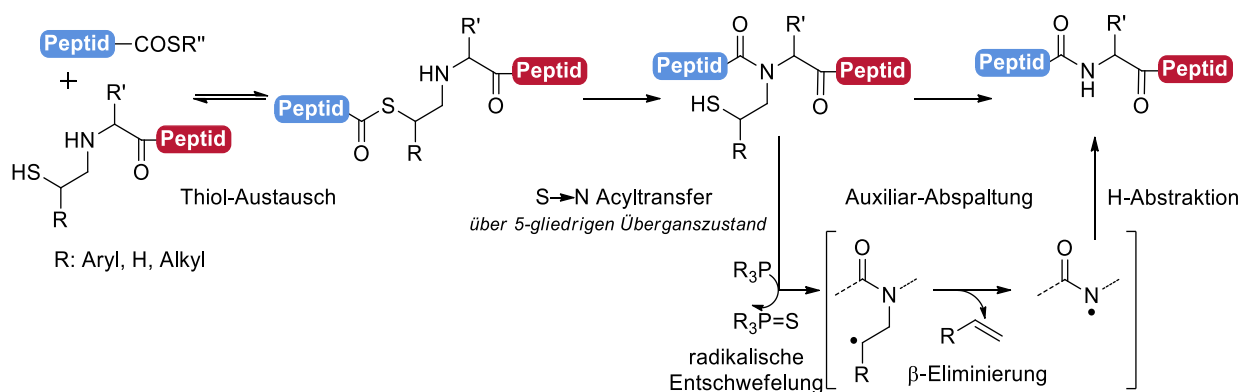


Abbildung 9: Konzept und hypothetischer Mechanismus zur Abspaltung der 2'-substituierten 2-Mercaptoethyl-Auxiliare: Im ersten Schritt führt der Thiol-Austausch zur Bildung des Thioester-verknüpften Intermediates, welches durch anschließenden S→N-Acyltransfer in das tertiär Amid-verknüpfte Ligationsprodukt überführt wird. Radikalische Entschwefelung ergibt das Kohlenstoff-zentrierte Radikal, welches durch nachfolgende β-Eliminierung und H-Abstraktion in das native Peptid/Protein überführt wird.

das 2-Mercapto-phenethyl-Auxiliar konzentrieren, da in diesem Fall die Abspaltung über ein stabilisiertes Benzylradikal-Intermediat verlaufen müsste. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einsatz unterschiedlicher 2'-Substituenten zu erproben und deren Einfluss auf die Geschwindigkeit der Verknüpfungsreaktion sowie der Auxiliar-Abspaltung zu untersuchen. Im Anschluss sollte die chemische Synthese zweier antimikrobieller Proteine durch Anwendung eines als leistungsfähig erkannten Auxiliars erfolgen, um den präparativen Nutzen der Methode zu demonstrieren.

Im dritten Kapitel stand die Entwicklung einer Methode zur chemischen Totalsynthese von Proteinen im Mittelpunkt, welche ohne eine einzige HPLC-Reinigung erfolgt. Nach gegenwärtigem Stand fallen während der chemischen Proteinsynthese eine Vielzahl von HPLC-basierten Reinigungsschritte an, um das Zielprotein in ausreichend hoher Reinheit zu erhalten. Diese sind nicht nur zeit- und kostenintensiv, sondern begrenzen auch den Durchsatz und Synthesemaßstab der in der chemischen Totalsynthese erreicht werden kann. Um diesem Problem entgegen zu wirken, sollte der Einsatz zweier orthogonaler Affinitäts- bzw. Reaktivitätsmarkierungen und Auxiliar-vermittelter Peptidligation in der HPLC-freien chemischen Proteinsynthese erprobt werden.

Der letzte Teil der Arbeit sollte das Konzept der N^α -Auxiliare erstmal auf Selenol-basierte Verknüpfungsreaktionen erweitert werden. Analog zur Selenoester-Selenocystein Ligation müsste der Einsatz von Selenol-Gruppen und Selenoestern deutlich schnellere Verknüpfungsreaktionen ermöglichen. Zusätzlich sollte aufgrund der relativ schwachen C-

Se-Bindung eine rasche radikalische Deselenierung in Gegenwart von Trialkylphosphinen gelingen und daher eine schnelle Initiierung der Auxiliär-Abspaltung erfolgen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Basenlabile Auxiliare für die ENCL

Die Auxiliar-vermittelte Peptidligation bietet einen vielversprechenden Ansatz, um die Reichweite der NCL über Cystein hinaus zu erweitern. Obwohl das Konzept dieser ENCL-Methode theoretisch nur eine einzige Hilfsverbindung benötigt, um einen Zugang zu jeder beliebigen Verknüpfungstellen zu ermöglichen, konnte in der Praxis bisher nur die Anwendung von N^α -Auxiliaren an glycinhaltigen Ligationsstellen demonstriert werden. Darüber hinaus erfordert die Abspaltung etablierter N^α -Auxiliare häufig den Einsatz von starken Säuren oder Supersäuren (siehe Kapitel 2.2.2). Unter diesen Bedingungen wurde bereits die Spaltung der im Zuge der Peptidligation aufgebauten Amidbindung in der Literatur beschrieben.^[50] Zusätzlich kann die Verwendung von Supersäuren für die Synthese posttranslational modifizierter Proteine problematisch sein.^[74]

4.1.1. Konzept der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare

Um die genannten Probleme zu lösen, sollte eine neue Klasse von N^α -Auxiliaren entwickelt werden, welche ENCL-Reaktionen auch an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsstellen ermöglichen und anschließend unter mild-basischen Bedingungen entfernt werden. Zu Beginn dieser Dissertation sollte der Einsatz von 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliaren **1a-c** untersucht werden (siehe Abbildung 10). Da der S→N-Acyltransfer in diesem Fall über ein 6-gliedriges Zwischenprodukt **5** verläuft (siehe Abbildung 10B), werden die Auxiliare im Folgenden als 6-ringbildende Auxiliare bezeichnet. Es wurde vermutet, dass das 3-Mercaptopropyl-Grundgerüst deutlich schnellere Verknüpfungsreaktionen erlauben sollte, da es zwei strukturelle Schwachstellen der häufig verwendeten *N*-Benzyl-basierten N^α -Auxiliare umgeht: (1) Durch die Vermeidung von verzweigten α -Positionen wird der sterische Anspruch des sekundären Amins, durch die benachbarte CH_2 -Gruppe, möglichst gering gehalten. (2) Die Peptidligation wird nicht über ein starres Arylsystem vermittelt, sondern erfolgt an einer flexiblen Alkylkette. Diese beiden Korrekturen sollten den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Auxiliar-vermittelten Peptidligation, den S→N-Acyltransfer, möglichst effizient gestalten. Im Anschluss an die Ver-

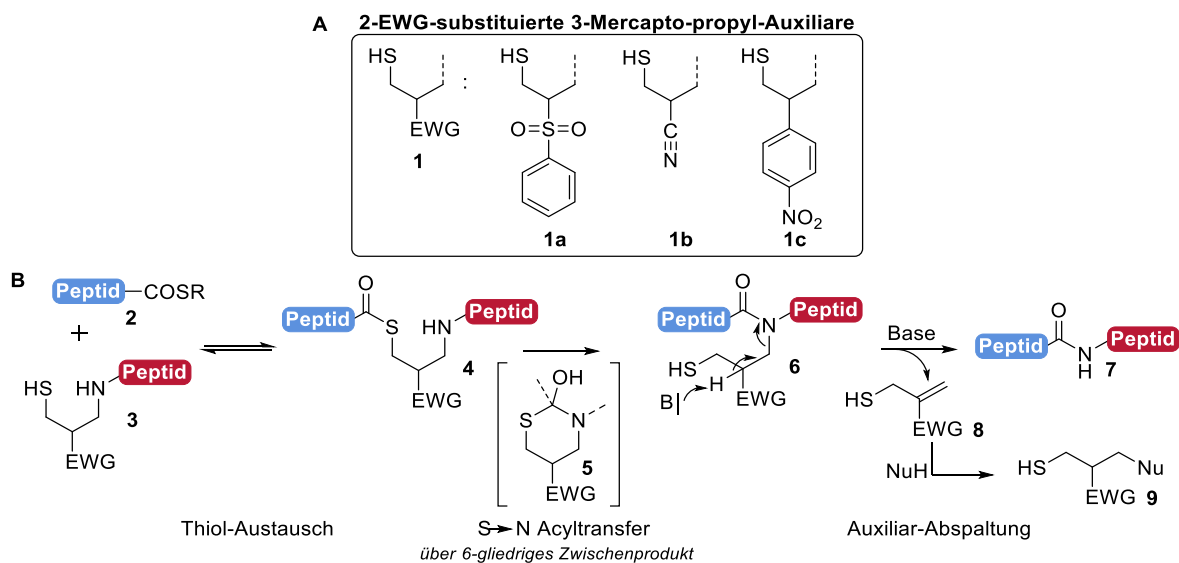


Abbildung 10: Chemische Strukturen der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare **1a-c** (A). Konzept der 6-ringbildenden Auxiliare für die ENCL (B): Die Auxiliare vermitteln die Verknüpfungsreaktion über ein 6-gliedriges Zwischenprodukt **5** und werden unter basischen Bedingungen vom Ligationsprodukt **6**, durch Deprotonierung des aciden H-Atoms und der anschließenden Eliminierungsreaktion, abgespalten. Die Elektronenmangelolefine **8** werden durch Verwendung nukleophiler Basen abgefangen, um unerwünschte Additionsreaktion an das Peptid **7** zu verhindern.

-knüpfungsreaktion sollten die 6-ringbildenden Auxiliare unter basischen Bedingungen entfernt werden. Durch die elektronenziehende Gruppe (EWG) müsste eine Deprotonierung des benachbarten, aciden H-Atoms unter schwach basischen Bedingungen gelingen und durch eine nachfolgende Eliminierungsreaktion das native Peptid **7** freisetzen. Die potentiell reaktiven Elektronenmangelolefine **8** könnten durch Verwendung von nukleophilen Basen abgefangen werden, um mögliche Additionsreaktionen an das Peptid zu verhindern.

Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, sollten im ersten Teil der Arbeit drei unterschiedliche 2-Elektronenakzeptor-substituierte 3-Mercaptopropyl Auxiliare **1a** (EWG = SO₂Ph), **1b** (EWG = CN) und **1c** (EWG = *p*-NO₂-C₆H₄) untersucht werden.

4.1.2. Synthese der 6-Ring-bildenden Auxiliarpeptide

Damit die Synthese der benötigten Auxiliarpeptide **3** im Zuge der SPPS erfolgen konnte, wurden zunächst die Auxiliar-modifizierten Glycinmonomere **15a-c** dargestellt (siehe Abbildung 11). Die Synthese des Phenylsulfonyl-substituierten Glycinmonomers **15a** erfolgte über das 1,3-Dichlor-substituierte Propylphenylsulfon **11**, welches nach einer literaturbekannten Arbeitsvorschrift von *Anzeveno et al.* durch Addition von Phenylsulfonylchlorid an Allylchlorid und nachfolgender Oxidation des Thioethers mit *meta*-Chlorper-

benzoesäure (mCPBA) erhalten wurde.^[75] Die Behandlung der Dichlorverbindung **11** mit Diisopropylamin (DIPEA) bei 0°C ergab das 2-substituierte Allylchlorid **12a**, welches ohne weitere Aufreinigung mit Glycin-*tert*-Butylester zur Reaktion gebracht wurde. Durch Verwendung des Allylchlorids **12a** im Unterschuss (0.3 Äq.) konnte eine weitere Alkylierung des sekundärenamins **13a** verhindert werden. Die anschließende Addition von *tert*-Butylmercaptan an die terminale Doppelbindung in Gegenwart von Tetrabutylammoniumfluorid als Katalysator lieferte den gewünschten Thioether **14a** in 44% Ausbeute. In diesem Schritt agiert das Fluorid-Anion als Base, welche das acide H-Atom der Mercaptofunktion abstrahiert und somit die Nukleophilie des Thiols in Form des Thiolats („nacktes Nukleophil“) erhöht, wodurch eine rasche Reaktion mit dem Michael-Akzeptor-ähnlichen Substrat **13a** ermöglicht wird.^[76] Im letzten Schritt der Synthese erfolgte die saure Hydrolyse des Esters **14a** mit Trifluoressigsäure, wodurch das gewünschte Phenylsulfonyl-modifizierte Auxiliarglycinkonjugat **15a** erhalten wurde. Die letzten beiden Syntheseschritte wurden in Zusammenarbeit mit Sebastian Brühl im Rahmen seines Forschungspraktikums optimiert (Kapitel 6.8.1).^[77] Zur Darstellung der Nitril- und *para*-Nitrophenyl-substituierten Auxiliarglycinkonjugate **15b** und **15c** wurde eine ähnliche Synthesestrategie erarbeitet. Nach einer literaturbekannten Vorschrift von *Krawczyk et al.* wurde durch Reaktion von Cyanoessigsäure mit Formaldehyd und Morpholin zuerst das tertiäre Amin **17b** erhalten. Hierbei erfolgen zwei Aminoalkylierungen an der CH-aciden Position der Cyanoessigsäure (Mannich-Reaktion) unter Abspaltung der Carbonsäure (Decarboxylierung). Durch Behandlung des *N*-alkylierten Morpholinderivates **17b** mit Isobutylchloroformiat wurde anschließend 2-Chlormethyl-

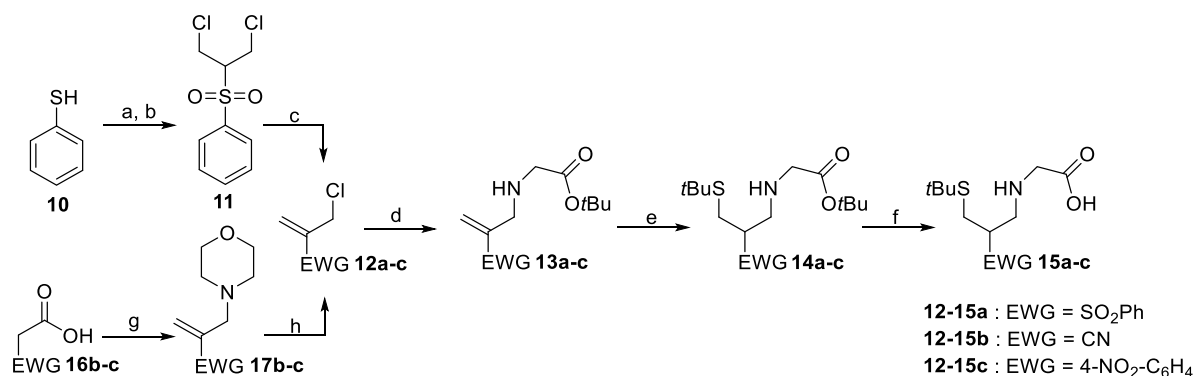


Abbildung 11: Synthese der Auxiliar-modifizierten Glycinmonomere **15a-c** : Bedingungen: a) C₃H₅Cl, *N*-Chlorsuccinimid, DCM, -40°C, 65%; b) mCPBA, DCM, 0°C, 77%; c) DIPEA, DCM, 0°C; d) Gly^{OtBu}, DIPEA, DCM, RT, 47% (**13a**), 2 Stufen, 86% (**13b**), 83% (**13c**); e) *t*BuSH, TBAF, RT, 44% (**14a**)^[77], 98% (**14b**), 79% (**14c**); f) **15a**: TFA, RT; **15b/c**: 4 M HCl in Dioxan, RT, quant.; (**15a-c**); g) (CH₂O)_n, Morpholin, Benzol (EWG = CN) oder Toluol (EWG = C₆H₄-NO₂), 80°C, 72% (**17b**), 47% (**17c**); h) *i*BuOCOCl, Benzol (EWG = CN) oder Toluol (EWG = C₆H₄-NO₂), 55% (**12b**), RT, 76% (**12c**).

acrylnitril (**12b**) erhalten.^[78] Diese Arbeitsvorschrift diente ebenfalls als Grundlage für die Synthese des *para*-Nitrophenyl-Auxiliarvorläufermoleküls **12c**. Die zweifache Mannich-Reaktion und nachfolgende Decarboxylierung verlief erfolgreich in Toluol durch Reaktion von 4-Nitrophenyllessigsäure mit Paraformaldehyd und Morpholin. Nach säulenchromatografischer Reinigung konnte das gewünschte tertiäre Amin **17c** in 47% Ausbeute erhalten werden. Die anschließende Reaktion mit Isobutylchloroformiat führte zur Spaltung der *N*-Allyl-Bindung und lieferte 2-Chlormethyl-Nitrostyrol **12c** (Ausbeute 76%). Im nächsten Schritt erfolgte die Konjugation der 2'-substituierten Allylchloride **12b** und **12c** mit Glycin-*tert*-Butylester. In beiden Fällen konnten die *N*-alkylierten Glycinester **13b** und **13c** in guten Ausbeuten (83-86%) erhalten werden. Durch nachfolgende TBAF-katalysierte Addition von *tert*-Butylmercaptan an die elektronenarmen Olefine **13b** und **13c** wurden die entsprechenden Thioether **14b** und **14c** erhalten, welche anschließend durch Behandlung mit 4M HCl in Dioxan in die Auxiliar-modifizierten Glycinmonomere **15b** und **15c** überführt wurden.

Im nächsten Schritt sollten die Auxiliar-Glycinkonjugate **15a-c** zur Synthese der Auxiliar-modifizierten Modellpeptide **20a-c** eingesetzt werden. Dazu wurden die *S*-*t*Bu-geschützten Monomere **15a-c** in DMF gelöst und in Gegenwart von Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidino-phosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und DIPEA an den N-Terminus des Harz-gebundenen Peptids **18*** gekuppelt (Abbildung 12). Die nachfolgende Behandlung mit TFA lieferte die *S*-*t*Bu-geschützten Auxiliar-Peptide **19a-c**. Zur Deblockierung der Mercaptofunktion wurde zunächst die Verwendung von TFMSA erprobt. Dazu wurden die Rohprodukte der *S*-*t*Bu-geschützten Auxiliar-Peptide **19a-c** in TFA/TFMSA/Ansiol (8/1/1, v/v/v) gelöst und 30 Minuten bei 0°C behandelt. Mit Hilfe von UPLC-/HPLC-Analysen (Anmerkung: Sofern nicht anders angegeben, wurde die Absorption bei $\lambda = 210$ nm detektiert) konnte gezeigt werden, dass im Fall der Phenylsulfonyl- und Nitrobenzyl-Auxiliarpeptide **19a** und **19c**, eine erfolgreiche Deblockierung der Mercapto-Funktion, unter Bildung der gewünschten Auxiliarpeptide **20a** und **20c**, erfolgte. Im Gegensatz dazu lieferte die Reaktion mit dem Nitril-Auxiliar-modifizierten Auxiliarpeptid **19b** unter diesen Bedingungen das Nebenprodukt **21b**, welches vermutlich durch saure Hydrolyse der Nitril-Funktion entstanden ist (Abbildung 12D'/F). Außerdem wurde die Abspaltung des Nitril-Auxiliars in Gegenwart von TFMSA beobachtet, was durch die Entstehung des nicht-modifizierten Peptids **18** belegt werden kann. Daraufhin wurde die Verwendung von Quecksilberacetat zur Spaltung des

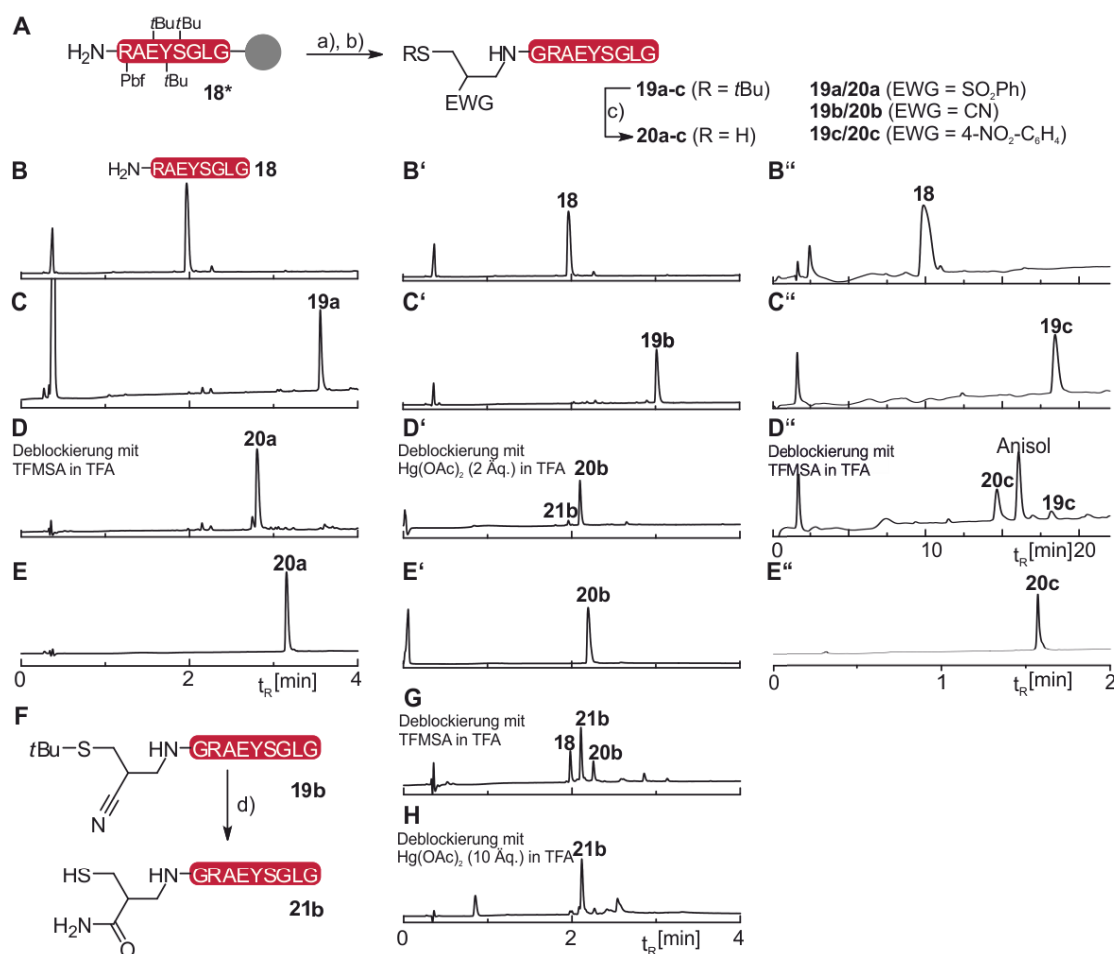


Abbildung 12: Synthese der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliärpeptide **20a-c** (A): UPLC- und HPLC-Analysen des Startmaterials **18** (B-B''), der erhaltenen Rohprodukte nach der Verknüpfungsreaktion (C-C''), nach Deblockierung der Mercaptofunktion in Gegenwart von TFMSA (D/D'') bzw. 2 Äq. $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (D') und der gereinigten Auxiliärpeptide (E-E''). Die Behandlung des Nitril-modifizierten Auxiliärpeptids **19b** mit TFMSA (G) oder 10 Äq. $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (H) führte zur Bildung des Nebenproduktes **21b**. Bedingungen: a) **15a-c**, PyBOP, DIPEA, DMF, RT; b) TFA/TIS/Wasser (95/2.5/2.5, v/v/v); c) für **19a/19c**: TFMSA/TFA/Anisol (8/1/1, v/v/v), 0°C; für **19b**: $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (2 Äq.) in TFA, 0°C, dann DTT (4 Äq.); d) TFMSA/TFA/Anisol (8/1/1, v/v/v), 0°C oder $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (10 Äq.) in TFA, 0°C, dann DTT (20 Äq.).

Thioethers am *S*-*t*Bu-geschützten Nitril-Auxiliär-Peptid **21b** erprobt. Dazu wurde das Rohprodukt bei 0°C in TFA gelöst und mit Quecksilberacetat zur Reaktion gebracht. Nach 30 Minuten wurde durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) die Reaktion gestoppt und der schwerlösliche Hg-DTT-Komplex per Zentrifugation und Filtration abgetrennt. Die UPLC-Analyse des erhaltenen Rohproduktes zeigt, dass durch Verwendung von $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (10 Äq.) ausschließlich das hydrolysierte Nebenprodukt **21b** gebildet wurde. Durch eine Verringerung des Überschusses an $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (10 Äq. → 2 Äq.) konnte die unerwünschte Nebenreaktion deutlich reduziert werden. Im nächsten Schritt erfolgte die Reinigung der Rohprodukte mittels präparativer HPLC, wodurch die Auxiliär-Modellpeptide **20a-c** in hoher Reinheit und akzeptablen Ausbeuten (**20a**: 26%, **20b**: 31%, **22c**: 22%) erhalten wurden.

4.1.3. Anwendung der 6-ringbildenden Auxiliärpeptide in der Peptidligation

Nach erfolgreicher Synthese der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliär-peptide **20a-c** sollten deren Einsatz in ENCL-Reaktionen erprobt werden. Im ersten Teil des Forschungsvorhabens sollten zunächst einfache Gly-Gly Verknüpfungsreaktionen untersucht werden. Die Synthese des dazu benötigten α -Peptidthioester **22G** erfolgte nach der Boc-Strategie im Rahmen der SPPS (Kapitel 6.4.2.). Vor der Verknüpfungsreaktion wurden die gereinigten Peptidfragmente **20a-c** und **22G** in wässriger 0.1% TFA gelöst, die Peptidkonzentration unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt (siehe 6.4.2.), die Auxiliärpeptide **20a-c** mit dem Peptidthioester **22G** in definierter Menge und Stöchiometrie vereint und anschließend gefriertrocknet. Durch Zugabe eines wässrigen Ligations-Puffers (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM TCEP, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) wurde die Auxiliär-vermittelte Verknüpfungsreaktion initiiert. Dabei dient TCEP als mildes Reduktionsmittel, um eine rasche Spaltung unerwünschter Disulfide zu ermöglichen.^[79] Die Verwendung von Thiophenol im Überschuss (3 Vol.-% PhSH; entspricht aufgrund der geringen Löslichkeit einer effektiven Konzentration von ca. 20 mM des Thiol-Additives)^[31] sollte eine Beschleunigung der Verknüpfungsreaktion ermöglichen, indem der eher unreaktive Alkylthioester **22G** in einen aktiven Aryl-Peptidthioester überführt wird.^[31] Der Reaktionsfortschritt der Peptidligationen wurde mit Hilfe von UPLC-Analysen verfolgt (Abbildung 13). In allen Fällen ermöglichten die 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliäre **1a-c** rasche Verknüpfungsreaktionen (Umsatz > 85% nach 120 Minuten). Durch Zugabe von wässriger 0.1% TFA wurde die Reaktion gestoppt, unlösliches Thiophenol durch Zentrifugation teilweise abgetrennt und anschließend die Rohprodukte mit Hilfe von präparativer HPLC aufgereinigt. Dabei konnten die gewünschten Ligationsprodukte **23a-c** in akzeptabler Ausbeute (**23a**: 66%; **23b**: 33%; **23c**: 56%) erhalten werden. Hierbei ist anzumerken, dass während der Peptidligation die Bildung der S- und N-acetylierten Produkte **24a** und **24c** beobachtet wurde, welche vermutlich durch eine Thiolaustauschreaktion der Ligationsprodukte **23a/23c** mit verbleibenden Peptidthioester **22G** gebildet wurden. Diese Nebenreaktion wurde bereits in Arbeiten von *Kent et al.* in Cystein-basierten Verknüpfungsreaktionen beschrieben^[80] und ist folglich keine individuelle Nebenreaktion der verwendeten 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliäre.

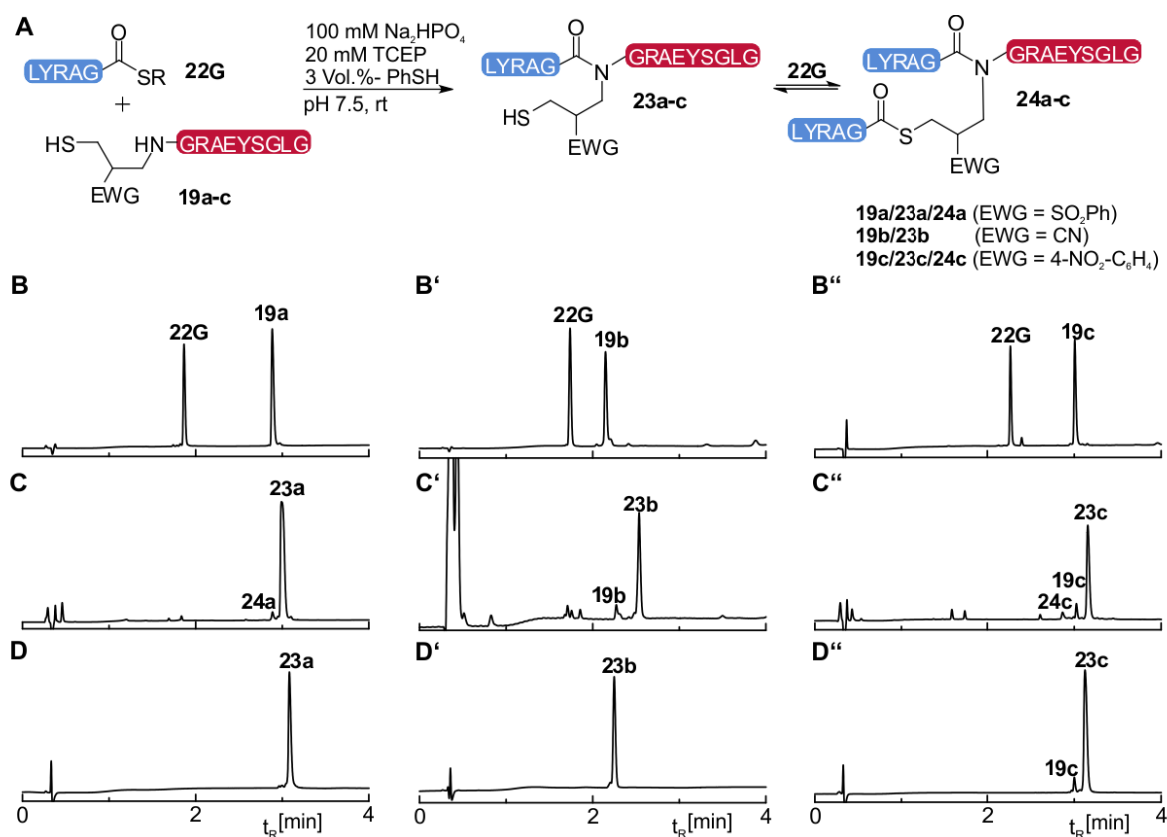


Abbildung 13: Anwendung der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare **1a-c** in der ENCL (A): Die Verknüpfungsreaktion des Peptidthioesters **22G** mit den Auxiliarpeptiden **20a-c** erfolgte im wässrigen Ligationspuffer und lieferte die Ligationen **23a-c**. UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der Peptidligation sowie der gereinigten Ligationen (D-D''). Während der Ligation konnten geringen Mengen der S- und N-acetylierten Produkte **24a/c** nachgewiesen werden.

Diese Nebenprodukte können durch einfache Zugabe von NaOH (Hydrolyse der Thioester-Peptidspezies, siehe Kapitel 6.13.4.) in die gewünschten Ligationen überführt werden und beeinträchtigen damit nicht die Ausbeute der Auxiliar-vermittelten Peptidligation.

4.1.4. Abspaltung der 6-ringbildenden Auxiliare

Nachdem die 6-ringbildende Auxiliare **1a-c** erfolgreich für die Synthese der Ligationen **23a-c** verwendet wurden, sollte im nächsten Schritt die Abspaltung der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Einheiten erprobt werden. Aus Vorarbeiten von Dr. Christian Haase^[51] und Dr. Ziv Harpaz^[52] war bekannt, dass Auxiliare der 1-Elektronenakzeptor-substituierten 4-Mercapto-but-2-yl-Grundstruktur (siehe 5-ringbildende Auxiliare in Abbildung 8A, EWG: CONH₂, COEt) unter basischen Bedingungen (pH 9-10) bei erhöhter Temperatur (50-80°C) abgespalten werden konnten. Da vermutet wurde, dass die Abspaltung der 6- und 5-ringbildenden Auxiliare nach einem ähnlichen

Mechanismus erfolgt, wurden die gereinigten Ligationsprodukte **23a-c** in basischen Reaktionslösungen (pH 10-12) gelöst ($c_{\text{Peptid}} = 0.5 \text{ mM}$) und bei 50°C inkubiert. In ersten Experimenten wurde das Auftreten von Racemisierung beobachtet, sobald die verwendeten Peptide stark basischen Bedingungen (10 mM NaOH, pH 12) bei 50°C ausgesetzt wurden. Daher wurden die folgenden Versuche zur Abspaltung der Auxiliare unter eher milderen Reaktionsbedingungen (max. pH 10) durchgeführt. Eine Auswahl der dabei erhaltenen Ergebnisse ist in Abbildung 14 dargestellt. Dem postulierten Mechanismus in Abbildung 10 entsprechend, sollte der Einsatz nukleophiler Basen von Vorteil sein, um mögliche Elektronenmangelolefine, welche im Zuge der Auxiliar-Abspaltung gebildet werden könnten, abzufangen. Aus diesem Grund wurde die Verwendung sekundärer Amine, wie Piperidin und Morpholin, erprobt. Die Behandlung der Ligationsprodukte **23a-c** mit 100 mM Morpholin (pH 10) in Wasser ermöglichte jedoch nicht die gewünschte Abspaltung der Auxiliare **1a-c**, sondern führte im Fall der Phenylsulfonyl- und der Nitril-modifizierten Ligationsprodukte **23a-b** zur Bildung der Morpholin-Addukte **26a/b** (Abbildung 14C-C'). Am Phenylsulfonyl-Auxiliar verläuft diese Nebenreaktion in nur fünf Stunden quantitativ. Im Fall des Nitril-Auxiliars konnte das terminale Olefin **25b** im Verlauf der Reaktion beobachtet werden (Abbildung 14C'). Demzufolge verläuft die Bildung der Morpholin-Addukte **26a/b** vermutlich über die Elektronenmangelolefine **25a/c**, welche wahrscheinlich durch die Eliminierung von Schwefelwasserstoff erhalten werden. Dieser Reaktionsweg wurde für das *para*-Nitrophenyl-Auxiliar erst bei erhöhter Temperatur (80°C) beobachtet. Bei einer Temperatur von 50°C führte die Behandlung des Nitrophenyl-modifizierten Ligationsproduktes **23c** mit 100 mM Morpholin hauptsächlich zur Bildung des symmetrischen Disulfides (**23c**)₂ und Spuren (~3%) des Eliminierungsproduktes **25c** (Abbildung 14C''). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Reaktivität kann anhand der berechneten pK_A -Werte^[81] der aciden β -Protonen (für die Auxiliar-Teilstrukturen **31a-c**, Abbildung 14F) abgeleitet werden, da zur Bildung der terminalen Olefine **25a-c** das β -ständige Proton abstrahiert werden muss. In Übereinstimmung mit den experimentellen Daten sollte, den berechneten pK_A -Werten zur Folge, die Deprotonierung an den Phenylsulfonyl- ($pK_A = 19.5$) und Nitril- ($pK_A = 25.2$) substituierten Auxiliaren wesentlich einfacher verlaufen, als im Vergleich zu dem *para*-Nitrophenyl-Auxiliar ($pK_A = 44.0$). Die Analyse der Reaktionsgemische nach 24 h Reaktionszeit ergab, dass auch unter diesen Bedingungen keine Abspaltung der Auxiliare **1a-c** erfolgte

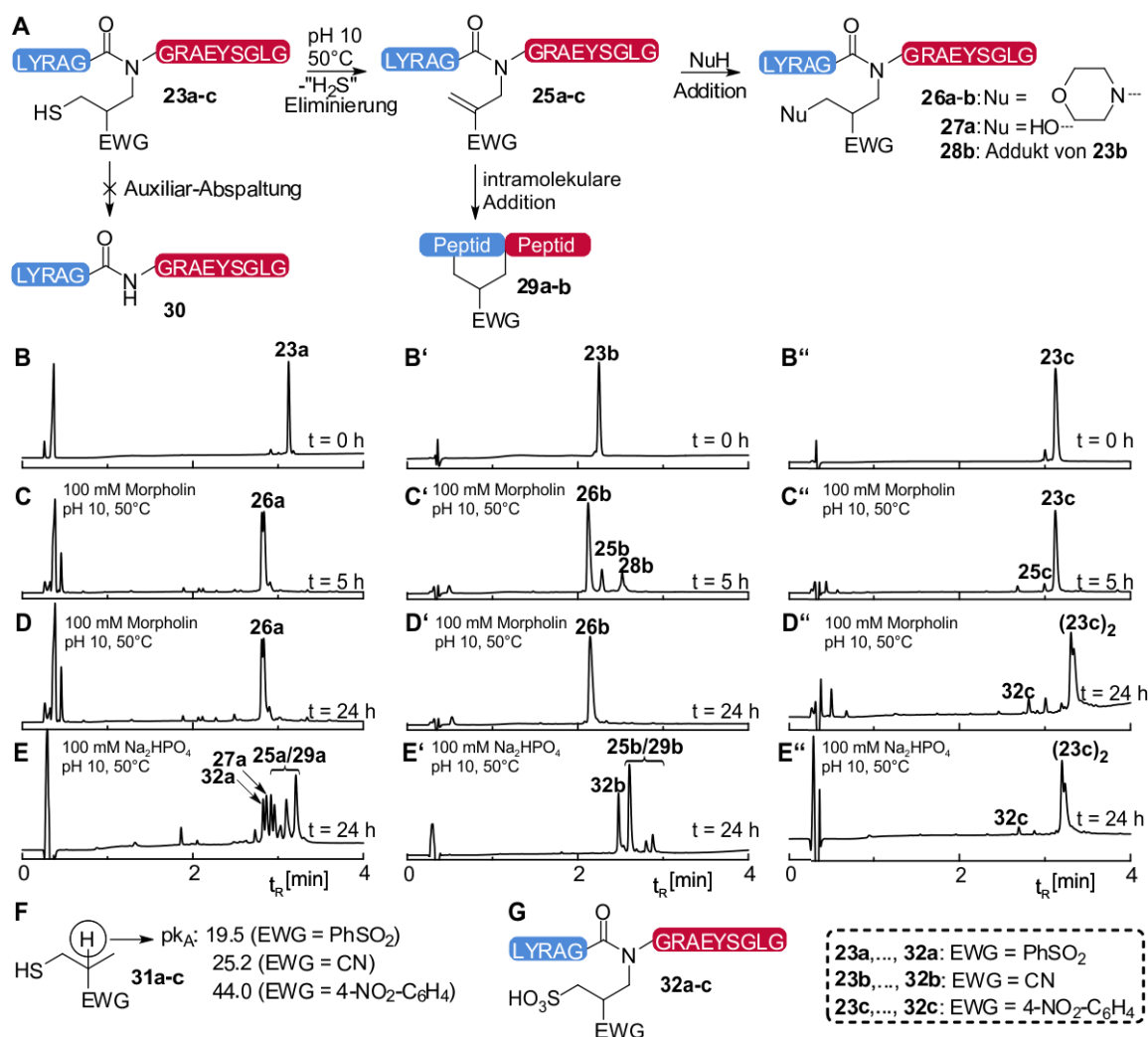


Abbildung 14: Beobachtete Reaktionswege der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare unter basischen Bedingungen (A): UPLC-Analyse vor (B-B'') der Reaktion und nach 5 h (C-C'') bzw. 24 h (D-D''); (E-E'') Reaktionszeit. Berechnete pK_A-Werte^[81] der Auxiliar-Teilstrukturen **31a-c** (F) und vermutete Struktur des Nebenproduktes **32a-c** (G). Bedingungen wie in den Abbildungen angegeben mit c(Peptid) = 0.5 mM; **(23c)₂**: Symmetrisches Disulfid von **23c**.

(Abbildung 14 E-E''). Im Fall des Nitrophenyl-modifizierten Ligationsproduktes **23c** wurde wie wieder das symmetrischen Disulfid **(23c)₂** als Hauptprodukt erhalten. Wie aus Chromatogrammen im weiteren Verlauf der Arbeit ersichtlich wurde, werden Disulfide der Auxiliarpeptide häufig als unsymmetrische Doppelpeaks beobachtet und sind nicht als Epimerisierung zu interpretieren. Für die Phenylsulfonyl- und Nitril-modifizierten Ligationsprodukte **23a-b** wurden komplexe Produktgemische erhalten. In beiden Fällen konnte mit Hilfe der MS-Analyse gezeigt werden, dass an beiden Auxiliaren die Eliminierung von Dihydrogensulfid als Hauptreaktion erfolgte. Da mehrere Produkte mit identischem m/z-Verhältniss gebildet wurden, ist davon auszugehen, dass die Elektronenmangelolefine in Abwesenheit nukleophiler Basen (wie zuvor Morpholin) intramolekulare Additionsreaktionen mit ausreichend reaktiven Funktionen des Peptids eingehen (Struktur **29a-b** in

Abbildung 14A). Unter den basischen Bedingungen wäre eine Reaktion der nukleophilen Seitenkettenfunktionen (Arg, Ser, Tyr) oder der N-terminalen Aminofunktion denkbar, was auch das Auftreten mehrerer Additionsprodukte erklären würde (Abbildung 14E/E'). Dass es sich hierbei um racemisierte Nebenprodukte handelt ist weniger wahrscheinlich, da am sequenzanalogen Nitrophenyl-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukt **23c** unter diesen Bedingungen keine Racemisierung beobachtet wurde. Neben den Eliminierungs- und Additionsprodukten wurden außerdem zwei weitere Nebenprodukte in geringen Mengen gebildet. Hierbei handelt es sich vermutlich um den Alkohol **27a**, welcher durch Reaktion des Elektronenmangelolefins **25a** mit Wasser entstanden sein könnte, und die Sulfonsäuren **32a-c**, welche auf Oxidationsreaktionen der Mercaptofunktionen hindeuten.

Auch wenn die Eliminierung an den 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliaren **1a-c** nicht das gewünschte native Peptid **30** lieferte, zeigten diese Ergebnisse erstmals, dass die β -ständigen Protonen eine ausreichende Acidität besitzen, um unter basischen Bedingungen deprotoniert zu werden. Zusätzlich kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Verwendung nukleophiler Basen hilfreich ist, um Additionsreaktionen an die Peptide zu verhindern. Unklar blieb jedoch weshalb die Mercaptofunktion während der Eliminierungsreaktion als Fluchtgruppe agierte, da diese unter den verwendeten basischen Bedingungen als Thiolat vorliegen sollte und daraus eher eine verringerte Reaktivität (Fluchtgruppeneigenschaft) hervorgehen müsste. Aufgrund dieser Überlegungen wurde vermutet, dass die formale Eliminierung von Schwefelwasserstoff über Disulfid-Peptidintermediate verlaufen könnte, welche sich unter den basischen Bedingungen in Abwesenheit geeigneter Reduktionsmittel rasch bilden sollten.^[82] Zur Reduktion potentieller (und nachgewiesener, Abbildung 14D''/E'') Disulfide wurde daraufhin der Einsatz von TCEP getestet. Dazu wurden die Ligationsprodukte **23a-c** in einer 20 mM TCEP-Lösung, die durch Zugabe von Morpholin (140 mM) auf pH 9 eingestellt wurde, gelöst und bei 50°C inkubiert. Im Fall des Phenylsulfonyl-modifizierten Peptids **23a** wurde anstelle des nativen Peptids **30** ausschließlich unerwünschte Nebenprodukte erhalten (Abbildung 15E). Die Charakterisierung dieser Nebenprodukte per ESI-MS-Analyse deutet darauf hin, dass hierbei die *N*-Allylpeptidspezies **33** und strukturell unbekannte TCEP-Addukte **34** gebildet wurden. Im Gegensatz dazu lieferte die Reaktion der Nitril- und Nitrophenyl-modifizierten Peptide **23b-c** in Gegenwart von TCEP und Morpholin erstmals das gewünschte

native Peptid **30** (Abbildung 15E'/E''). Die Abspaltung des Nitril-Auxiliars verlief mit deutlich geringerer Selektivität unter Bildung des Hydroxyl-Adduktes **27b** und einem weiteren Nebenprodukt **35**, welches vermutlich aus einer Additionsreaktion des im Überschuss verwendeten TCEP (40 Äq.) an das intermediär gebildete Elektronenmangelolefin **25b** hervorgeht. Zusätzlich konnte im Reaktionsgemisch selbst nach 24 h noch verbleibendes Startmaterial **23b** nachgewiesen werden. Die Analyse der Auxiliar-Abspaltung am Nitrophenyl-modifizierten Ligationsprodukt **23c** zeigte einen vollständigen Umsatz unter Bildung des gewünschten Zielpeptids **30** als Hauptprodukt (Anmerkung: Im Folgenden werden unmodifizierten Zielpeptide, welches nach der Auxiliar-Abspaltung erhalten werden als „native Peptide“ bezeichnet). Die im Chromatogramm (Abbildung 15E'') beobachteten Verunreinigungen des Rohproduktes deuten jedoch darauf hin, dass zu geringen Anteilen eine Spaltung des Peptids an der Gly-Gly-Stelle erfolgt und in sehr geringem Ausmaß noch weitere unerwünschte Nebenreaktionen auftreten (ausführliche Diskussion Seite 40). Weitere

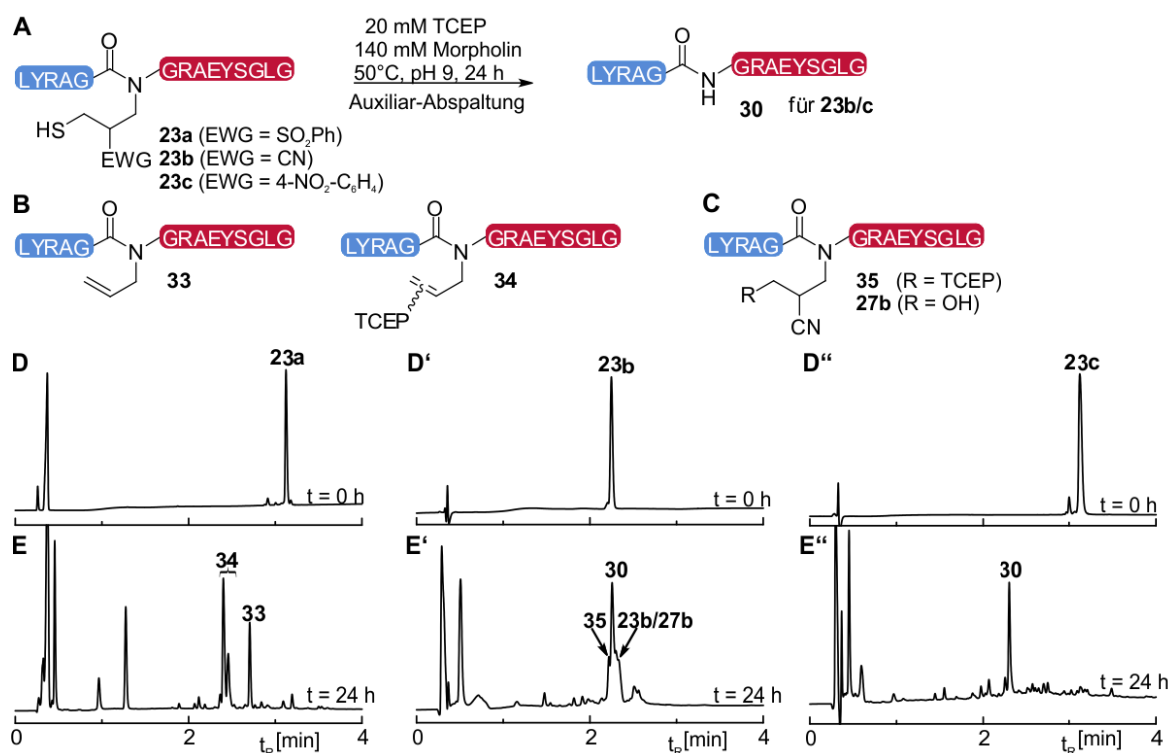


Abbildung 15: Versuche zur Abspaltung der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare unter basischen Bedingungen in Gegenwart von TCEP (A): Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen konnte die Bildung des nativen Peptids **30** für die Ligationsprodukte **23b/c** nachgewiesen werden (E', E''). Vermutete Strukturen der beobachteten Nebenprodukte im Fall des Phenylsulfonyl-(B) und Nitril-(C) Auxiliars. UPLC-Analyse vor (D-D'') und nach (E-E'') 24 h Reaktionszeit. Die Auxiliar-Abspaltungsreaktionen wurden bei einer Peptidkonzentration von 0.5 mM durchgeführt.

Versuche die Selektivität der Auxiliar-Abspaltung an den Phenylsulfonyl- und Nitril-modifizierten Ligationsprodukten **23a/23b** durch Variation der TCEP- und Morpholin-Konzentration zu verbessern, blieben erfolglos. Aus diesem Grund wurden die vielversprechenden Ergebnisse des Nitrophenyl-Auxiliars (im Folgenden als „6NP-Auxiliar“ abgekürzt) zum Anlass genommen, die nachfolgenden Forschungsarbeiten auf dieses Grundgerüst zu konzentrieren.

Zunächst wurde versucht, die Selektivität der Auxiliar-Abspaltung durch Verwendung der stärkeren Base Piperidin ($pK_s = 11.1$)^[83], anstelle von Morpholin ($pK_s = 8.5$)^[83], zu verbessern. Unter diesen Bedingungen (20 mM TCEP, 140 mM Piperidin, pH 11, 50°C) konnte jedoch kein vollständiger Umsatz des Startmaterials erreicht werden (Abbildung 16C). Zusätzlich wurde das Auftreten von Racemisierung beobachtet, weshalb die Verwendung von Piperidin nicht weiter verfolgt wurde. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Entfernung des 6NP-Auxiliars unter milderen Bedingungen (pH 8.5) erreicht werden konnte. Dazu wurde das 6NP-Auxiliar-modifizierte Ligationsprodukt **23c** mit einer wässrigen Lösung aus TCEP (20 mM) und Morpholin (80 mM) über 24 h bei 50°C behandelt. Die UPLC-Analyse (Abbildung 16D) der Reaktion zeigte erneut eine erfolgreiche Abspaltung des Auxiliars an, jedoch wurde unter diesen milderen Bedingungen ein bisher nicht beobachtetes Nebenprodukt **36** gebildet (Struktur unbekannt, analytische Daten: Tabelle 2, Abschnitt 6.11.1). Die MS-Analyse deutete darauf hin, dass es sich hierbei um die Addition eines Nitrobenzyl-Restes an das Peptid handelt. Die Nebenreaktion wurde nicht weiter untersucht, da sie durch Verwendung eines erhöhten pH-Wertes (pH = 9.5) verhindert werden konnte. Allerdings deutet die Bildung dieses Nebenproduktes auf eine Fragmentierung des Auxiliars hin, welche möglicherweise nach der Abspaltung vom Peptid im Reaktionsmedium erfolgt. Diese Überlegungen wurden durch die massenspektroskopische Identifizierung der 2-(*para*-Nitrophenyl)-ethyl-modifizierten Peptidspezies **37** unterstützt. Diese konnte sowohl bei pH 11 als auch pH 8.5 (Abbildung 16C/D/J/K) beobachtet werden und geht möglicherweise aus einer Spaltung der C-C-Bindung an der Benzylposition (formale Abspaltung von HSCH_2) im Auxiliar hervor.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob durch Verwendung eines erhöhten Überschusses an TCEP (100 mM; 200 Äq.) und Morpholin (400 mM, 800 Äq.) die Selektivität der Abspaltungsreaktion erhöht werden konnte. Hierbei wurde jedoch ein geringer Umsatz des Startmaterials beobachtet (Abbildung 16E). Dieses Ergebnis kann nicht mit dem

vorgeschlagenen baseninduzierten Eliminierungsmechanismus (Abbildung 10) erklärt werden, da diesem zur Folge die Abspaltung der 2-Elektronen-akzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare **1a-c** durch eine Erhöhung der Basen-Konzentration beschleunigt werden sollte. Da die Effizienz der Auxiliar-Abspaltung durch eine Erhöhung der TCEP- und Morpholin-Konzentration nicht verbessert werden konnte, wurde anschließend der Einfluss der Temperatur auf die Selektivität der Auxiliar-Abspaltung untersucht. Dazu wurde das Ligationsprodukt **30** in einer wässrigen Lösung (pH 9) von TCEP (20 mM) und Morpholin (140 mM) gelöst und bei unterschiedlichen Temperaturen (25-70°C) inkubiert, bis ein vollständiger Umsatz des Startmaterials per UPLC-Analyse nachgewiesen werden konnte (Abbildung F-K). Dabei zeigte sich, dass bei niedrigen Temperaturen (25-30°C) ein vollständiger Umsatz erst nach zwei Tagen mit akzeptabler Selektivität (55-58%) erreicht wurde. Bei Temperaturen von 40-50°C erfolgte die Abspaltung des Auxiliars deutlich schneller (16 h) und lieferte die nativen Peptide in nur leicht verminderter Reinheit (Selektivität: 50-53%). Bei hohen Temperaturen (60-70°C) verlief die Reaktion besonders rasch (8 h). Allerdings wurde das Nitrophenyl-Auxiliar unter diesen Bedingungen mit deutlich geringerer Selektivität (34-47%) entfernt, was hauptsächlich aus der zunehmenden Bildung der Peptidfragmente **39**, **40** und **42-22** resultiert. Es wurde vermutet, dass diese Fragmente entweder aus einer direkten Hydrolyse der leicht zugänglichen Gly-Amidbindungen resultieren oder durch eine N→S-Acytransfer-Reaktion des Auxiliar-tragenden Startmaterials **23c** induziert werden (Abbildung 16L). Im letzteren Fall könnten sich hierbei unterschiedliche Thioester-Intermediate **38** bilden, welche unter den basischen Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung zügig hydrolysiert werden müssten. Anschließend könnte die Abspaltung des Auxiliars vom N-Terminus der möglichen C-terminalen Fragmente **41** unter Bildung der Peptide **42-44** erfolgen. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden, weshalb die Spaltung des Peptids erst in Gegenwart von TCEP beobachtet wurde und nicht bereits bei Behandlung des Startmaterials **23c** mit wässrigen Lösungen von Morpholin (ohne TCEP) bei pH 10. Im späteren Teil der Arbeit wird diese Nebenreaktion im Zusammenhang mit einem radikalischen Auxiliar-Abspaltungsmechanismus genauer diskutiert. Ähnliches trifft auf die N-Formyl-Peptidspezies **42** zu, welches ebenfalls in Kapitel 4.2.8 als plausibles Nebenprodukt einer Radikalreaktion beschrieben wird. Um die UPLC-basierte analytische Auswertung der unterschiedlichen Reaktionsansätze zu überprüfen, wurden die Rohprodukte mit Hilfe einer

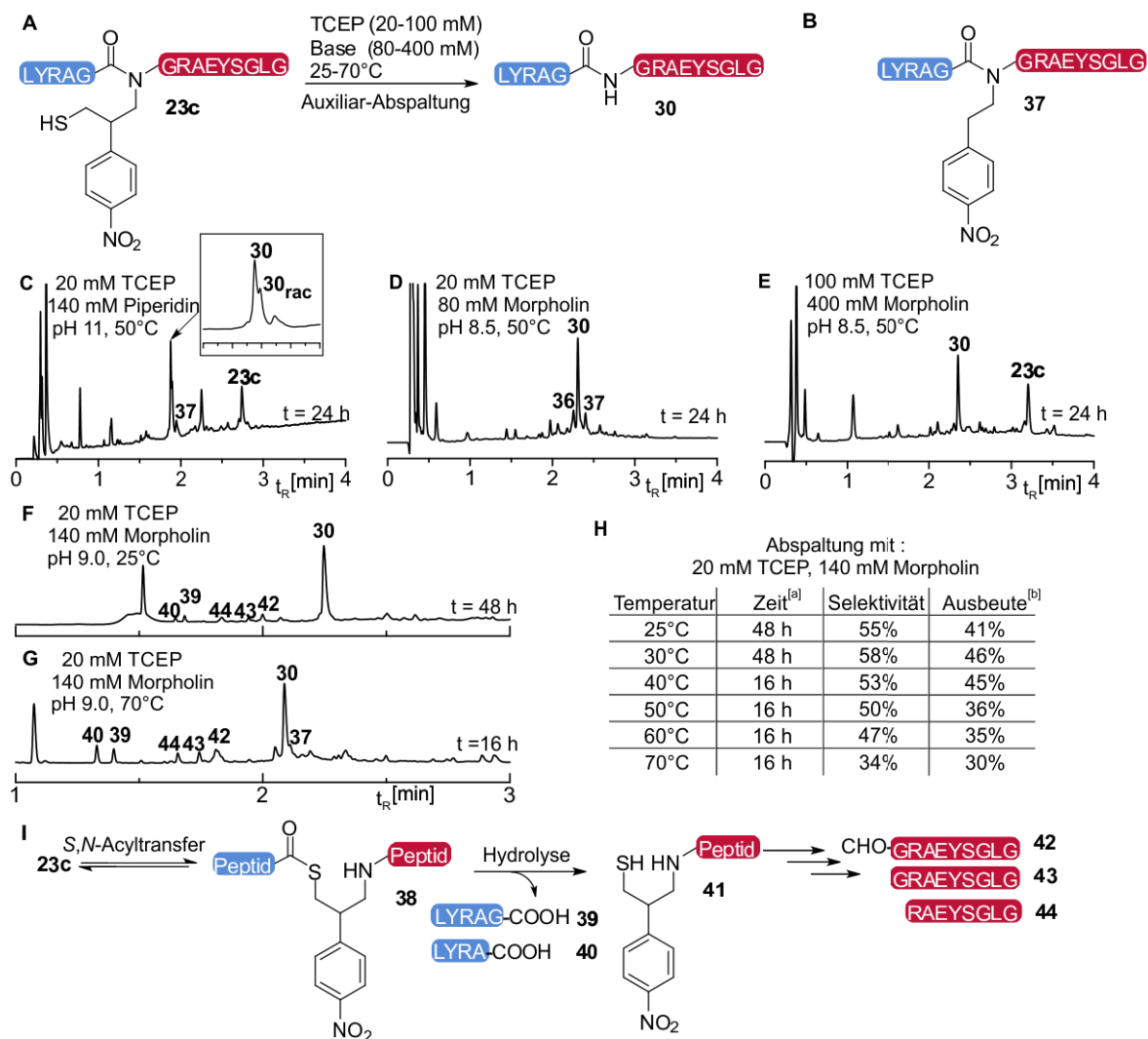


Abbildung 16: Versuche zur Abspaltung des 6NP-Auxiliars: Die Reaktion des Ligationsproduktes **23c** liefert unter basischen Bedingungen in Gegenwart von TCEP das native Peptid **30** (A). UPLC-Analysen der Auxiliar-Abspaltung in Gegenwart von Piperidin (C), bei niedriger (D) und hoher (E) TCEP- und Morpholin-Konzentration sowie bei unterschiedlichen Temperaturen (F, G). Tabellarische Übersicht (H) der Ergebnisse der Auxiliar-Abspaltung bei unterschiedlichen Temperaturen: [a] Benötigte Zeit zum vollständigen Umsatz des Startmaterials; [b] isolierte Ausbeute. Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung der N- und C-terminalen Peptidfragmente (39/40 bzw. 42–44). Bedingungen: c(Peptid) = 0.5 mM; **30_{rac}**: racemisiertes Peptid **30**; **37**: Nitrobenzyl-Addukt von **30**.

semi-präparativen HPLC gereinigt und anschließend die Ausbeute an nativen Peptid **30** spektroskopisch bestimmt. In guter Übereinstimmung mit den zuvor ermittelten analytischen Ausbeuten (Selektivität) der Auxiliar-Abspaltung konnte gezeigt werden, dass bei erhöhten Temperaturen (50–70°C) deutlich geringere Ausbeuten (30–36%) erhalten wurden als unter eher milden Reaktionsbedingungen (25–40°C, Ausbeute 41–46%). Unter Anbetracht der relativ kurzen Reaktionszeit (16 h) und einer Ausbeute von 45% erscheint die Abspaltung bei 40°C das beste Ergebnis zu liefern.

Durch die erfolgreiche Synthese des nativen Peptids **30** konnte erstmals das Potential des 6NP-Auxiliars als nützliches Werkzeug für die chemische Peptidsynthese demonstriert werden. Im Vergleich zu den häufig verwendeten *N*-Benzyl-basierten Auxiliaren, welche in Gegenwart von starken Säuren entfernt werden müssen, sollte die Verwendung des basenlabilen Auxiliars die Synthese von säureempfindlichen Peptiden oder Proteinen deutlich vereinfachen. Zusätzlich müsste es möglich sein, die Abspaltung im direkten Anschluss an die Peptidligation, ohne eine zeitaufwändige intermediäre Reinigung und Gefriertrocknung des Ligationsproduktes, durchzuführen.

Um die Machbarkeit dieser zweistufigen Reaktionsfolge zu untersuchen (Abbildung 17), wurde das Auxiliarpeptid **19c** mit dem Glycinpeptidthioester **22G** im wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5, RT) verknüpft und anschließend durch Zugabe von Morpholin (finale Konzentration 140 mM) die Auxiliar-Abspaltung bei 50°C erprobt (Abbildung 17B). Nach 18 h konnte im Reaktionsgemisch allerdings nur Spuren des gewünschten nativen Peptids **30** festgestellt werden (Abbildung 17B). Im Vergleich zu den Ergebnissen, welche am gereinigtem Ligationprodukt unter ähnlichen Bedingungen erhalten wurden, ermöglichte die Reaktion im Eintopf-Format deutlich weniger Umsatz (~45%) und Selektivität (~11%). Folglich musste eine Komponente des Ligationspuffers die Auxiliar-Abspaltung stören. In diesem Zusammenhang wurde das Experiment in Abwesenheit des Thioladditives wiederholt. Unter diesen Bedingungen (Abbildung 17C) erreichte die Reaktion einen höheren Umsatz (~66%) und verlief deutlich selektiver (~32% Selektivität). Aus diesem Grund wurden die folgenden Versuche zur Abspaltung des 6NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation ohne Thiophenol durchgeführt. Unter Annahme einer baseninduzierten Auxiliar-Abspaltung wurde im nächsten Schritt die Reaktion in Gegenwart von 200 mM und 400 mM Morpholin bei niedriger TCEP-Konzentration (10 mM) erprobt. Trotz des hohen Überschusses (400-800 Äq.) an Base konnte in beiden Experimenten nur ein geringer Umsatz (11-13%, nach 24 h) des Ligationproduktes nachgewiesen (Abbildung 17D). Anhand der nahezu identischen Ergebnisse (Abbildung 17, Tabelle: Eintrag 3-4) erschien es plausibel, dass womöglich die TCEP-Konzentration für den Erfolg der Auxiliar-Abspaltung entscheidend ist. Um diese Überlegungen zu überprüfen, wurde die Peptidligation bei hoher TCEP-Konzentration (40 mM) durchgeführt und direkt im Anschluss, durch Zugabe von Morpholin (400 mM), die

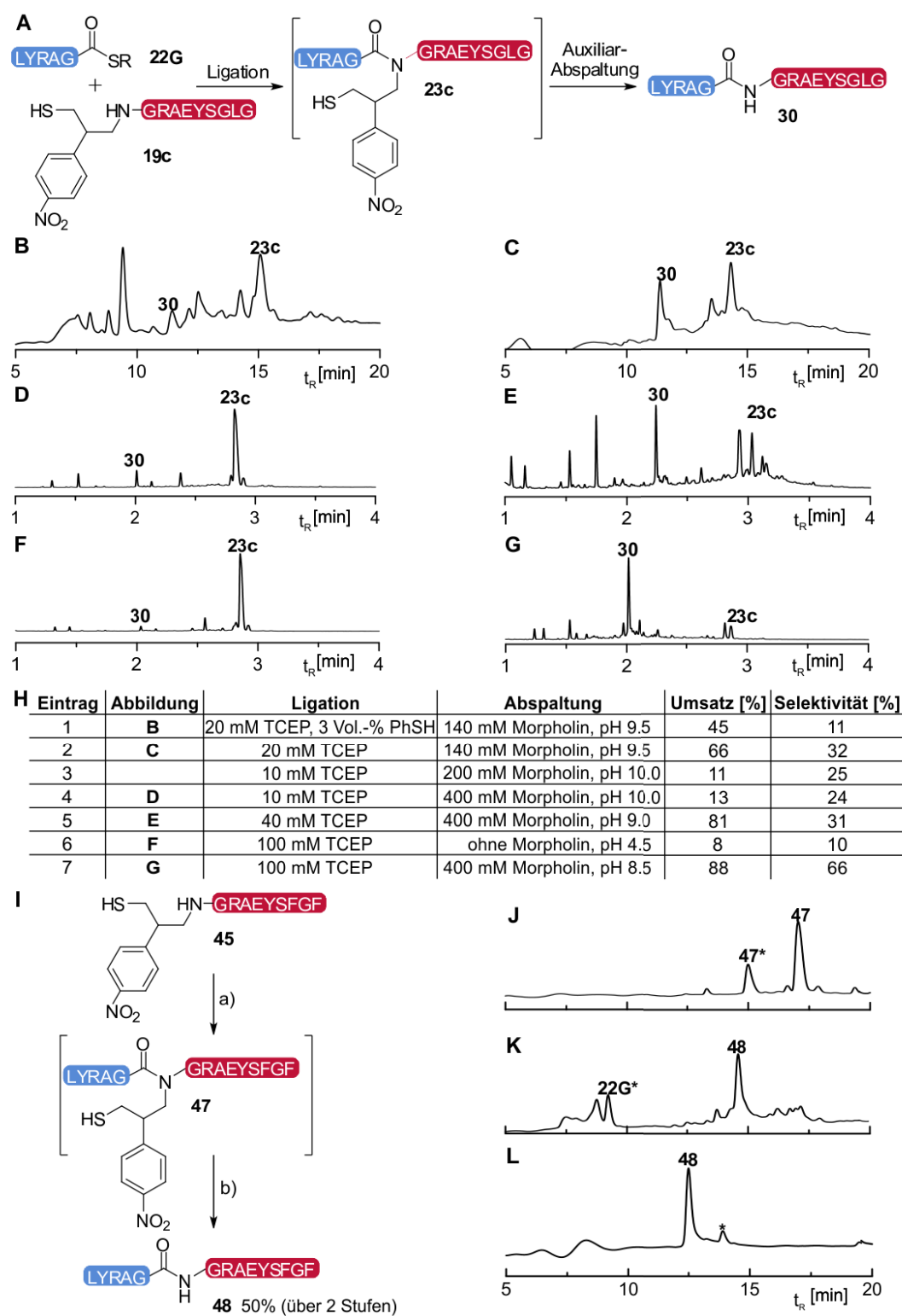


Abbildung 17: Abspaltung des 6NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (A): HPLC (B-C) und UPLC-Analyse (D-G) der Auxiliary-Abspaltung bei 40°C unter den Bedingungen, welche in der Tabelle angegeben sind (H). Umsatz und Selektivität wurden per Integration und Verrechnung der relevanten Signale ($\lambda = 210 \text{ nm}$) abgeschätzt. Direkte Auxiliary-Abspaltung im direkten Anschluss an die Peptidligation (I): HPLC-Analyse nach der Peptidligation (J), nach Abspaltung des Auxiliars (K) und des gereinigten Peptids 48 (L). Bedingungen: a) 100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5, RT, $c(\text{Peptid}) = 2.0 \text{ mM}$, 3 h; b) $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 18–24 h; a) $c(\text{Peptid}) = 2.0 \text{ mM}$, 100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5, RT, 5 h; b) $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 100 mM TCEP, 400 mM Morpholin, pH 8.5, 40°C, 20 h; R: $(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$; 47*: S- und N-acetyliertes Produkt, 22G*: Aminolyse von 22G/47* durch Morpholin; *: Verunreinigung des HPLC-Systems.

Auxiliar-Abspaltung bei 40°C und 50°C ausgelöst. Die UPLC-Analyse (Abbildung 17E) der Reaktion zeigte, dass durch Verwendung eines höheren Überschusses an TCEP (40 mM \approx 80 Äq.) deutlich mehr Ligationsprodukt (\sim 81% Umsatz) in das native Peptid **30** überführt wurde. Durch eine weitere Erhöhung der TCEP-Konzentration (100 mM) konnte in Gegenwart von 400 mM Morpholin schließlich ein verbesserter Umsatz (\sim 88%) des intermediär erhaltenen Ligationsproduktes mit akzeptabler Selektivität (66%) erreicht werden. Allerdings wurde die Auxiliar-Abspaltung durch alleinige Zugabe von 100 mM TCEP nahezu vollständig gestoppt (Abbildung 17F). Folglich sind zur effizienten Abspaltung des 6NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation basische Bedingungen (pH 8-10) und eine ausreichend hohe Konzentration an TCEP (100 mM) notwendig.

Anschließend wurden die optimierten Bedingungen für die Synthese des Modellpeptids **48** erprobt (Abbildung 17I). Dazu wurde das Auxiliarpeptid **45** (c(Peptid) = 2 mM) in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) mit einem leichten Überschuss des Peptidthioester **22G** (\sim 1.25 Äq.) zur Reaktion gebracht. Nach fünf Stunden erreichte die Peptidligation einen vollständigen Umsatz unter Bildung des Ligationsproduktes **47** und dem S- und N-acetylierten Produkt **47*** (Abbildung 17J). Die anschließende Zugabe einer wässrigen Lösung von TCEP (100 mM) und Morpholin (400 mM) löste bei 40°C die gewünschte Abspaltung des Auxiliars aus. Unter diesen Bedingungen wurde das native Peptid **48** als Hauptprodukt (Abbildung 17K) nachgewiesen und nach Anwendung einer präparativen HPLC mit einer Gesamtausbeute von 50% (über zwei Stufen) isoliert. Zum Vergleich lieferte die Synthesestrategie bei der jeweils eine HPLC-Reinigung nach der Peptidligation und nach der Auxiliar-Abspaltung erfolgte nur eine Gesamtausbeute von 26% (an Zielpeptid **30**). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch Anwendung der zweistufigen Reaktionsfolge, ohne intermediäre Reinigung des Ligationsproduktes, deutlich höhere Gesamtausbeuten erhalten werden können. Zusätzlich erlaubt diese Methode einen deutlich schnelleren Zugang zu den gewünschten Peptiden, da keine Reinigung und Gefriertrocknung der Ligationsprodukte notwendig ist. Die höhere Gesamtausbeute resultiert vermutlich aus der verringerten Anzahl der Reinigungsschritte, da pro HPLC-Reinigung und anschließender Gefriertrocknung ein Produktverlust von ca. 25% erfolgt. Die Rückgewinnungsrate (ca. 75%) der HPLC-basierten Reinigungsprozedur (präparative HPLC und Gefriertrocknung) wurde durch eigene Messungen bestimmt.

4.1.5. Konzept des 5-ringbildenden *para*-Nitrophenyl-Auxiliars

Aufgrund der in Kapitel 4.1.4 diskutierten Resultate, welche durch Verwendung der *para*-Nitrophenyl-Gruppe erzielt wurden, sollte im nächsten Teil der Arbeit die Eignung dieses elektronenziehenden Substituenten für die basenlabilen 1-Elektronenakzeptor-substituierten 4-Mercapto-but-2-yl Auxiliare untersucht werden (Abbildung 18). Im Gegensatz zu den 6-ringbildenden Auxiliaren verläuft die Peptidligation an diesem Grundgerüst über ein 5-gliedriges Zwischenprodukt **51**. Aufgrund des elektronenziehenden Effekts der Nitrophenylgruppe wurde erwartet, dass unter basischen Bedingungen eine Abstraktion des aciden Protons an der β -Position (CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft zu EWG) erfolgt. Die anschließende Eliminierungsreaktion sollte zu einer Ablösung des Auxiliars vom Peptidrückgrat führen und damit das native Peptid **7** liefern. Um unerwünschte Additionsreaktionen des während der Reaktion anfallenden Elektronenmangelolefins **53** zu vermeiden, sollten nukleophile Basen eingesetzt werden.

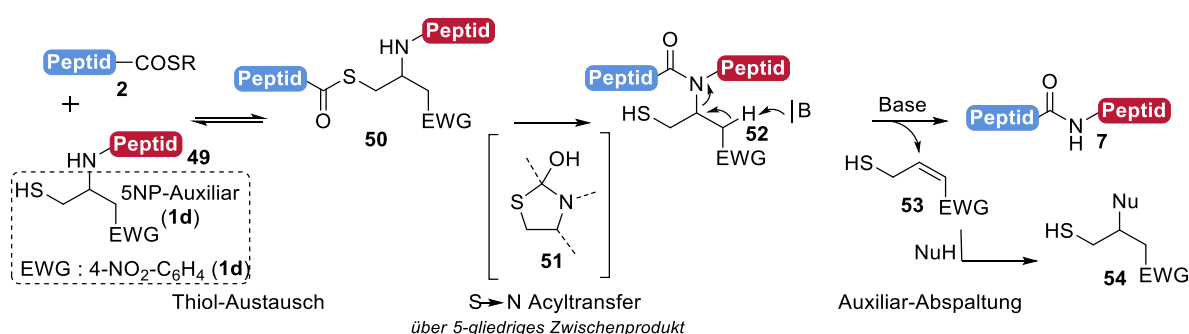


Abbildung 18: Die Konzept des 5-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliars für die ENCL: Das Auxiliar vermittelt die Verknüpfungsreaktion über ein 5-gliedriges Zwischenprodukt **51** und wird unter basischen Bedingungen vom Ligationsprodukt **52**, durch Deprotonierung des aciden H-Atoms und der anschließenden Eliminierungsreaktion, abgespalten. Das Elektronen-mangelolefin **53** wird in Gegenwart nukleophiler Basen abgefangen, um unerwünschte Additionsreaktionen an das Peptid **7** zu verhindern.

4.1.6. Synthese von 5-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliarpeptide

In Arbeiten von Dr. Ziv Harpaz konnte gezeigt werden, dass die reduktive Aminierung von Harz-gebundenen Peptiden mit entsprechenden Vorläufer-Ketonen eine zuverlässige Synthese von Auxiliar-peptiden erlaubt.^[52] Aus diesem Grund wurde diese Synthesestrategie für das 5-ringbildende Nitrophenyl-Auxiliar (Abkürzung: 5NP) adaptiert. Ausgehend von 4-Nitroanilin wurde die Synthese des benötigten Auxiliar-Ketons erarbeitet (Abbildung 19).

Durch aromatische Allylierung des Startmaterials und nachfolgender Oxidation des terminalen Alkens in Gegenwart von *meta*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA) konnte das literaturbekannte Epoxid **55** erhalten werden.^[84] Die anschließende regioselektive Öffnung des Epoxids gelang in Gegenwart von TBAF als Base und lieferte den gewünschten Thioether **56** (79% Ausbeute). Im letzten Schritt wurde der *S*-*t*Bu-geschützte Alkohol **56** durch Verwendung von Dess-Martin-Periodinan zum entsprechenden Keton **57** oxidiert (58% Ausbeute).

Anschließend wurde die Einführung des Auxiliars auf dem Harz-gebundenen Modellpeptid durch reduktive Aminierung erprobt. Um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten erfolgte die Reaktion mit einem Überschuss an Keton (20 Äq.) und NaCNBH_3 (20 Äq.). Zusätzlich wurde Orthoameisensäuretrimethylester (TMOF), als wasserziehendes Mittel zugesetzt. Nach 24 h konnte ein nahezu vollständiger Umsatz des Startmaterials und die Bildung des gewünschten *S*-*t*Bu-geschützten Auxiliar-Peptids **59** nachgewiesen werden (Abbildung 19D). Im Zuge der Auxiliar-Peptidsynthese wurde die Bildung der Sulfon-Peptidspezies **59*** als Nebenprodukt beobachtet, welche möglicherweise aus einer Oxidation des Thioethers **59** resultiert. Zusätzlich konnte das *N*-formylierte Startmaterial **42** (Struktur in Abbildung 16) im Rohprodukt nachgewiesen werden, welches wahrscheinlich aus einer

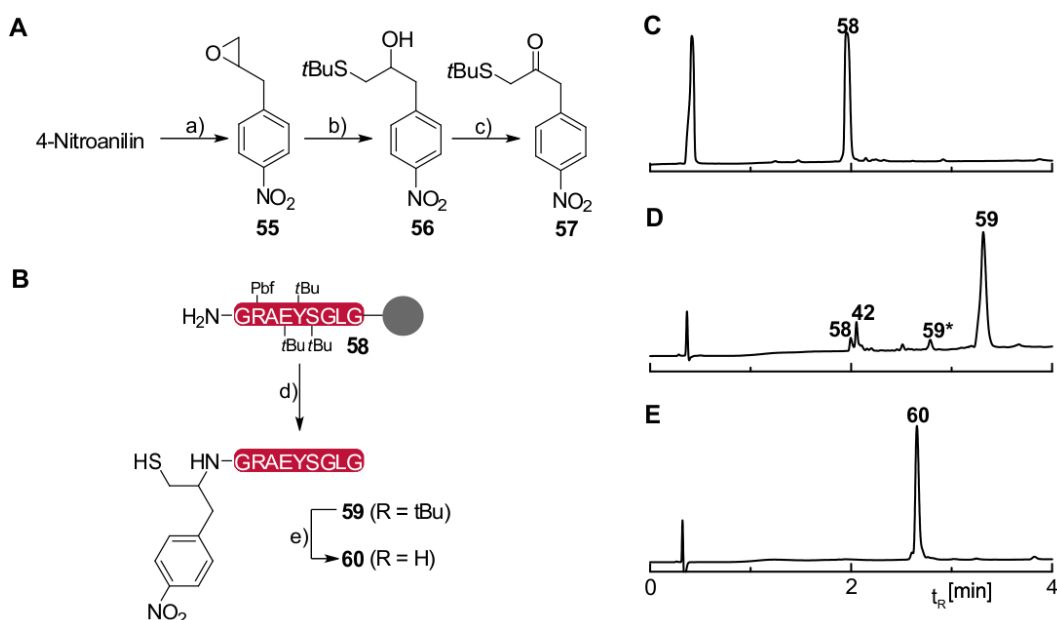


Abbildung 19: Synthese des *S*-*t*Bu-geschützten Ketons **57** (A) und des 5NP-Auxiliarpeptids **60** (B): UPLC-Analyse des nach der TFA-Behandlung erhaltenen Startmaterials **58** (C), des erhaltenen Rohproduktes nach der reduktiven Aminierung und TFA-Behandlung (D) sowie des gereinigten Auxiliarpeptids **60** (E). Bedingungen: a) $t\text{BuNO}_2$, $\text{C}_3\text{H}_5\text{Br}$, CH_3CN , 50°C dann *m*CPBA, DCM, 0°C , 41% (über zwei Stufen); b) $t\text{BuSH}$, TBAF, RT 79%; c) Dess-Martin-Periodinan, DCM, $t\text{BuOH}$, RT 58%; d) **57**, NaCNBH_3 , AcOH, $\text{CH}(\text{OMe})_3$, MeOH, DMF, RT, dann TFA/TIS, RT; e) TFA/TFMSA/Anisol, 0°C , 20% (über 3 Stufen); **42**: CHO-GRAYESGLG; **59***: Sulfonbildung durch Oxidation des Thioethers **59**.

Reaktion des primären Amins **58** und TMOF hervorgeht^[85]. Anschließend erfolgte die Deblockierung der Mercapto-Funktion bei 0°C in Gegenwart von TFMSA/TFA/Anisol. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und dabei das gewünschte Auxiliarpeptid **60** isoliert (20% Ausbeute über 3 Stufen).

4.1.7. Vergleich der 5- und 6-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliare in ENCL-Reaktionen

Nach erfolgreicher Synthese des 5NP-Auxiliarpeptids **60** erfolgte dessen Einsatz in der Auxiliar-vermittelten Peptidligation. Da ab diesem Zeitpunkt zwei strukturell unterschiedliche Auxiliare mit gleichen elektronenziehenden Substituenten zur Verfügung standen, sollten die beiden Grundgerüste anhand ihrer Reaktivität in ENCL-Reaktionen verglichen werden. Dazu wurden die beiden Nitrophenylauxiliar-Peptide **19c** und **60** in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) gelöst und mit unterschiedlichen α -Peptidthioester **22X** (X = G, A, L) bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht (Abbildung 20). Im Fall des Glycinpeptidthioesters **22G** erfolgten die Verknüpfungsreaktionen besonders rasch und lieferten das jeweilige Ligationsprodukt **63G/64G** in 95% Ausbeute. Eine genaue Analyse des Reaktionsverlaufs zeigte, dass die Peptidligation im Fall des 6-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliars bereits nach 4 Minuten eine Ausbeute von 50% erreichte. Im Gegensatz dazu benötigte das 5NP-Auxiliar 14 Minuten, um ebenfalls 50% Produkt zu liefern. Anschließend wurde die Reaktion der beiden Auxiliarpeptide mit dem Alaninpeptidthioester **22A** untersucht. Aufgrund des C-terminalen Alanin-Restes ist die sterische Hinderung im Vergleich zur Gly-Gly Verknüpfungsreaktion erhöht, weshalb die Peptidligationen langsamer verlaufen. Die UPLC-Analyse zeigte, dass 50% Produktbildung im Fall des 6NP-Auxiliars nach knapp einer Stunde (t_{50} = 66 min) erreicht wurde, wohingegen das 5-ringbildende Auxiliar mehr als sechs Stunden benötigte. Abschließend erfolgte die ENCL-Reaktion der beiden Auxiliarpeptide mit dem Leucinpeptidthioester **22L**. Die anspruchsvolle Verknüpfungsreaktion verlief an beiden Grundgerüsten erfolgreich und erreichte im Fall des 6NP-Auxiliars eine hohe Ausbeute von 90% nach 24 h. Das Leu-Gly-Verknüpfungsprodukt **63L** wurde als Doppelpeak beobachtet (Abbildung 20C'), welcher vermutlich aus der chromatographischen Auftrennung der Diastereoisomere resultiert. Auch die 5-Ring-Variante lieferte das gewünschte

Ligationsprodukt **64L** als Doppelpeak (Abbildung 20E'), allerdings nur mit einer Ausbeute von 66% Ausbeute nach 24 h. Auch anhand der t_{50} -Werte (Abbildung 20D) ist für die Leu-Gly-Verknüpfungsreaktionen eine deutlich verminderte Reaktivität des 5NP-Auxiliars zu erkennen. Da aus Arbeiten von *Illuminati et al.* bekannt war, dass Macrolactonisierungen

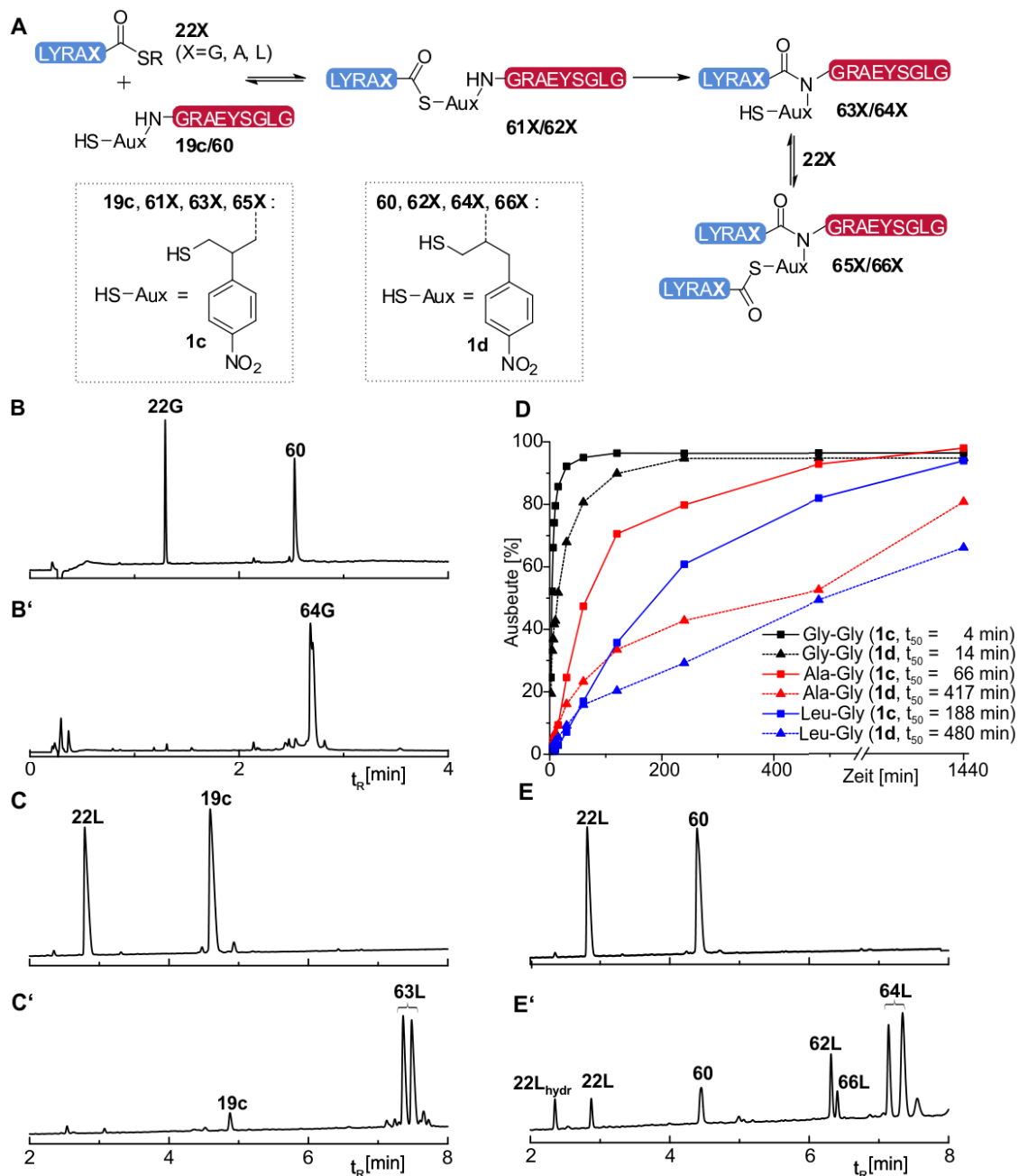


Abbildung 20: Einsatz des 6NP- und 5NP-Auxiliars (**1c** bzw. **1d**) in ENCL-Reaktionen (A): Die Verknüpfungsreaktionen der Peptidthioester **22X** mit den Auxiliarpeptiden **19c/60** erfolgten im wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5, c(Peptide) = 5 mM) unter Bildung der Ligationen **63X/64X**. UPLC-Analysen vor der Peptidligation (**B**, **C**, **E**) und nach 24 h (**B'**, **C'**, **E'**). Zeitlicher Verlauf der analytischen Ausbeuten und ermittelte t_{50} -Werte (Zeit für 50% Ausbeute) für die Verknüpfungsreaktionen von **19c/60** und **22X** (**D**). **22L_{hydr}**: Hydrolyse des Peptidthioesters **22L**. **63L/64L** erscheinen als Doppelpeaks aufgrund der Auftrennung der Diastereomere.

(O→O-Acylshift) schneller über 5- als 6-gliedrige Intermediate verlaufen^[86], wurde ursprünglich angenommen, dass die Verwendung des 5-ringbildenden Auxiliars schnellere Verknüpfungsreaktionen ermöglichen sollte. Es wurde deshalb vermutet, dass die verminderte Reaktionsgeschwindigkeit des 5-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliars maßgeblich durch den tertiären Kohlenstoff des Auxiliar-Gerüsts, welcher sich in direkter Nachbarschaft des an der Ligation beteiligten sekundären Amins befindet (α -Position), bedingt wird. Dieser erhöht den sterischen Anspruch des sekundären Amins und müsste folglich den S→N-Acyltransfer, welcher aus Arbeiten von *Dawson et al.* bereits als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Auxiliar-vermittelten Peptidligation identifiziert wurde^[48c], erschweren. Dieses Verhalten konnte besonders deutlich im Fall der Leu-Gly-Ligation verfolgt werden. Hierbei wurde selbst nach 24 h noch das Thioester-Intermediat **64L** nachgewiesen (Abbildung 20E'). Demzufolge wird die Geschwindigkeit der Peptidligation auch an diesem Grundgerüst durch den S→N-Acyltransfer bestimmt. Auch im Fall des 6-Ring-bildenden Auxiliars konnten stets Thioester-Intermediate im Verlauf der Peptidligationen nachgewiesen (nicht gezeigt, siehe Diplomarbeit Kathleen Hennig^[87]), weshalb auch hier die Reaktionsgeschwindigkeit auf gleichem Weg limitiert wird. Allerdings befindet sich eine flexible und unverzweigte Methylen-Einheit in α -Position, welche den sterischen Anspruch des C-terminalen sekundären Amins vergleichsweise gering hält und folglich einen rascheren S→N-Acyltransfer ermöglicht.

Abschließend ist anzumerken, dass in Arbeiten von Dipl. Chem. Kathleen Hennig^[87] und M. Sc. Carmen Juds^[88] die Anwendung der 5NP- und 6NP-Auxiliare an Ala-Ala-Verknüpfungsstellen untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass keine Verknüpfungsreaktionen an diesen sterisch anspruchsvollen Ligationsstellen erfolgt und damit die Reichweite der beiden der 5NP- und 6NP-Auxiliare auf glycin-haltige Ligationstellen beschränkt ist.

4.1.8. Abspaltung des 5-ringbildenen Nitrophenyl-Auxiliars

Im nächsten Schritt wurde die Abspaltung des 5NP-Auxiliars (**1d**) untersucht. Dem vorgeschlagenen Mechanismus in Abbildung 18 entsprechend, sollte die Abspaltung des 5NP-Auxiliars unter basischen Bedingungen gelingen. Um dies zu überprüfen, wurde das

gereinigte Ligationsprodukt **64G** in einer wässrigen 100 mM Morpholin-Lösung (pH 10) und in 100 mM Phosphatpuffer (pH 10) bei 50°C über 24 h inkubiert. Mit Hilfe der UPLC-MS Analyse konnte gezeigt werden, dass die Auxiliar-Abspaltung in beiden Reaktionsansätzen nicht erfolgte (Abbildung 21C). Anstelle des nativen Peptids konnte lediglich das Disulfid **(64G)₂** des Startmaterials nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass die Entfernung des Auxiliars nicht durch die Bildung der Disulfidpeptidspezies **(64G)₂** verhindert wird, wurde die Reaktion in Gegenwart von TCEP wiederholt. Dazu wurde das Ligationsprodukt **64G** in einer 20 mM TCEP-Lösung, die durch Zugabe von Morpholin (140 mM) auf pH 9 eingestellt wurde, gelöst und bei 50°C inkubiert. Wie schon zuvor für das 6NP-Auxiliar (**1c**) beobachtet wurde, erfolgte unter diesen Bedingungen ein vollständiger Umsatz des Startmaterials **64G** unter Bildung des nativen Peptids **30** als Hauptprodukt (42% Selektivität, Abbildung 21D). Um eine effizientere Deprotonierung des aciden Wasserstoff-Atoms zu ermöglichen und somit die Auxiliar-Abspaltung zu beschleunigen, wurde der Einsatz von Piperidin getestet. In Gegenwart dieser starken Base wurde jedoch das Auftreten von Racemisierung beobachtet, weshalb die Reaktion unter diesen Bedingungen (pH 11) mit deutlich verringerter Selektivität (25%) verläuft. Zur Vermeidung von Racemisierung, wurde anschließend die Abspaltung des Auxiliars unter milderen basischen Bedingungen (pH 8.5) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsführung bei pH 8.5 weniger Umsatz (71%) und Selektivität (29-32%) ermöglicht (Abbildung 21: Tabelle; Eintrag 5/6). Interessanterweise konnte selbst mit einem hohen Überschuss von TCEP (100 mM, 200 Äq.) und Morpholin (400 mM, 800 Äq.) bei pH 8.5 kein vollständiger Umsatz des Startmaterials erreicht werden. Im nächsten Schritt wurde die Auxiliar-Abspaltung in Gegenwart von 20 mM TCEP und 140 mM Morpholin bei Temperaturen unter 50°C untersucht. Bei 40°C verlief die Reaktion deutlich selektiver (64%) und ermöglichte nach 16 h einen nahezu vollständigen Umsatz (95%). Im Gegensatz dazu konnte bei 25°C erst nach 42 h kein Startmaterial mehr nachgewiesen werden. Die Auxiliar-Abspaltung erfolgte bei dieser Temperatur mit besonders hoher Selektivität (77%). Das verbesserte Ergebnis kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Einerseits wird bei niedrigen Temperaturen deutlich weniger Spaltung des Peptids unter Bildung der Peptidfragmente **39**, **40** und **42** beobachtet (Abbildung 21D/G). Andererseits werden die beiden Nebenprodukte **67/68** (Abbildung 21H) bei pH 9 in geringeren Mengen gebildet, als im Vergleich zu pH 8.5 (Abbildung 21E/G). Wie im späteren Teil der Arbeit noch genauer

diskutiert wird, ist die Entstehung solcher Aldehyd-tragenden Nebenprodukte vermutlich auf einen radikalischen Mechanismus zurückzuführen (Kapitel 4.2.8).

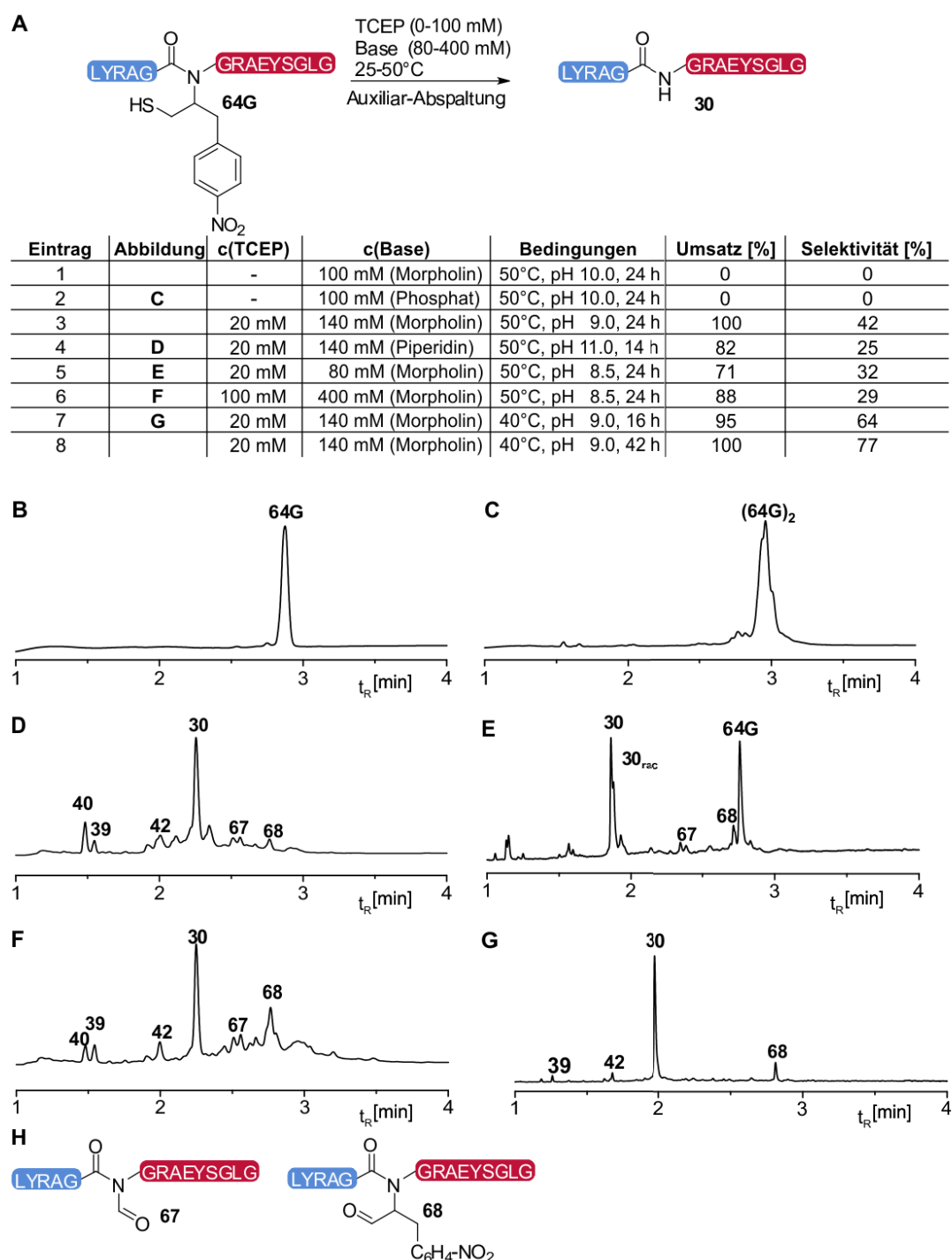


Abbildung 21: Versuche zur Abspaltung des 5NP-Auxiliars (A): Die Reaktion des Ligationsproduktes **64G** liefert unter basischen Bedingungen in Gegenwart von TCEP das native Peptid **30**. Umsatz und Selektivität wurden per Integration und Verrechnung der relevanten Signale ($\lambda=210\text{nm}$) abgeschätzt. UPLC-Analyse vor (B) und nach (C-G) der Auxiliar-Abspaltung unter den Bedingungen, welche in der Tabelle angegeben sind (A). Vermutete Strukturen der Nebenprodukte **67** und **68** (H). Die Abspaltungen wurden mit einer Konzentration von $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$ durchgeführt. **30_{rac}**: racemisiertes Peptid **30**; **(64G)₂**: Disulfid von **64G**.

Um den präparativen Nutzen des 5NP-Auxiliars zu überprüfen, wurde das Ligationsprodukt **64G** für 22 h bei 40°C mit einer wässrigen Lösung von 20 mM TCEP und 140 mM Morpholin behandelt. Durch Anwendung einer präparativen HPLC-Reinigung konnte das gewünschte native Peptid **30** in hoher Reinheit (Abbildung 22C) und Ausbeute (39%) erhalten werden. Zusätzlich wurde die Abspaltung des 5NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation durchgeführt (Abbildung 22D). Dazu wurde das Auxiliarpeptid **60** in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) bei 2 mM-Konzentration mit einem Überschuss des Peptidthioester **22G** (~1.25 Äq.) zur Reaktion gebracht. Nach fünf Stunden

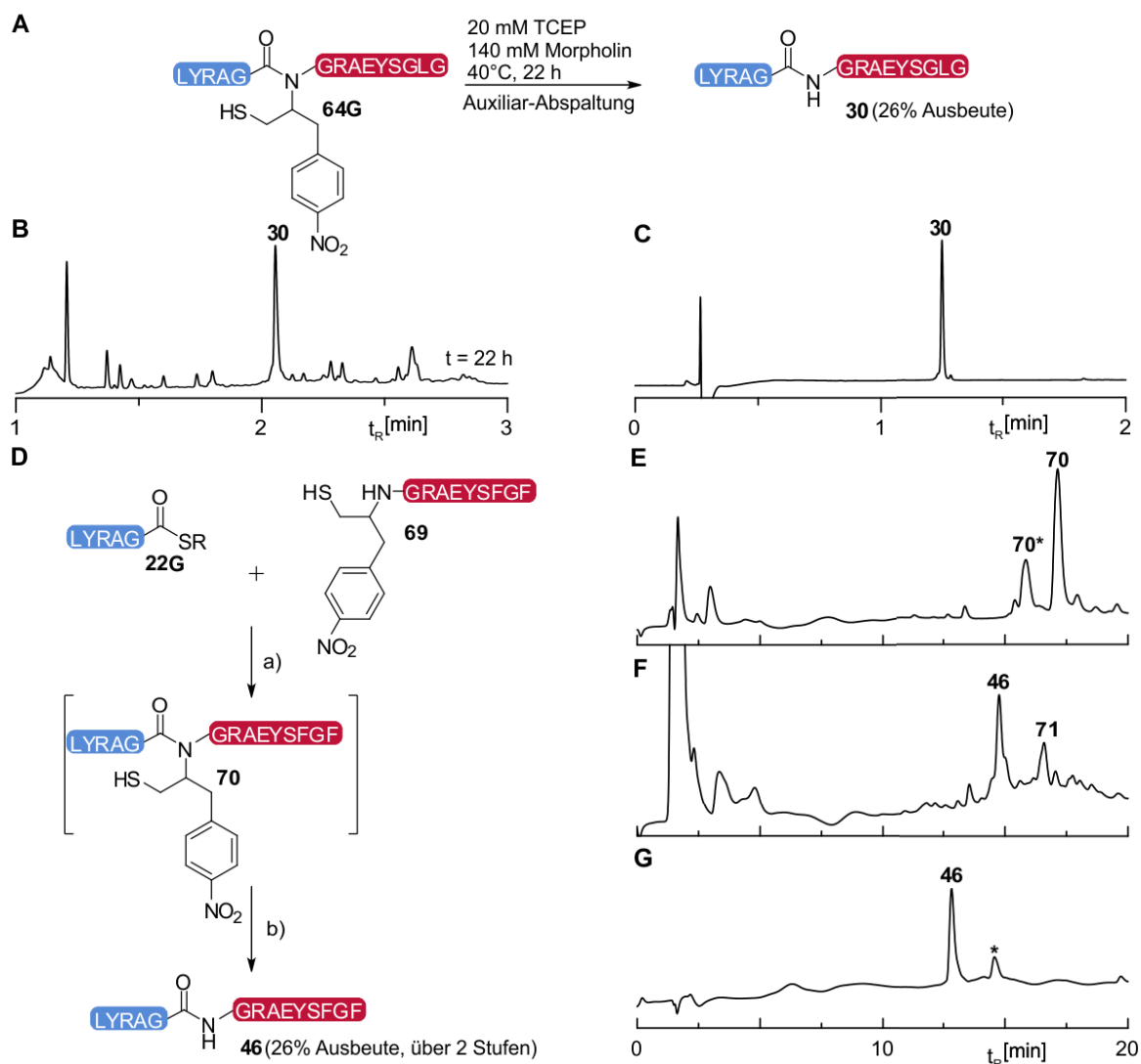


Abbildung 22: Abspaltung des 5NP-Auxiliars vom gereinigten Ligationsprodukt **64G** (A): UPLC-Analyse des erhaltenen Rohproduktes nach der Auxiliar-Abspaltung (B) und des gereinigten Peptids **30** (C). Die Verknüpfungsreaktion von **22G** und **69** ergibt das Ligationsprodukt **70**, welches ohne weitere Reinigung in das native Peptid **46** überführt wird (D). UPLC-Analyse nach der Peptidligation (E), nach der Auxiliar-Abspaltung (F) und des gereinigten Peptides **46** (G). Bedingungen: a) c(Peptid) = 2.0 mM, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7.5, RT, 5 h; b) c(Peptid) = 0.5 mM, 100 mM TCEP, 400 mM Morpholin, pH 8.5, 40°C, 20 h; R: (CH₂)₂CONHCH₂CONH₂; **70***: S- und N-acetyliertes Produkt. *: Verunreinigung des HPLC-Systems; **71**: Mögliche Aldehyd-Peptidspezies (analog Struktur **68** in Abbildung 21).

erreichte die Peptidligation einen vollständigen Umsatz unter Bildung des Ligationsproduktes **64G** und dem S- und N-acetylierten Produkt **70*** (Abbildung 22E). Wie schon zuvor für das 6NP-Auxiliar beobachtet, konnte durch anschließende Zugabe einer wässrigen Lösung von TCEP (100 mM) und Morpholin (400 mM) die gewünschte Abspaltung des Auxiliars bei 40°C initiiert werden. Die HPLC-Analyse bestätigte die Bildung des nativen Peptids **48** als Hauptprodukt (Abbildung 22F), welches durch Anwendung einer präparativen HPLC-Reinigung in einer Gesamtausbeute von 27% (über zwei Stufen) isoliert wurde (Abbildung 22G). Im Vergleich zu dem 6NP-Auxiliar (50%, zwei Stufen) lieferte die 5-Ring-Variante damit eine geringere Ausbeute, was vermutlich auf die Bildung der unerwünschten Aldehyd-Auxiliarspezies **71** (analog zu Struktur **68**, Abbildung 21) zurückzuführen ist. Die Synthesestrategie bei der jeweils eine HPLC-Reinigung nach der Peptidligation (66% Ausbeute) und nach der Auxiliar-Abspaltung (39%) erfolgt, ermöglichte eine nahezu identische Gesamtausbeute (26%). Damit ist im Fall des 5NP-Auxiliars die Anwendung der zweistufigen Reaktionsfolge ohne intermediäre HPLC-Reinigung lediglich aufgrund des verringerten Zeitaufwandes von Vorteil.

4.1.9. Diskussion des Auxiliar-Abspaltungsmechanismus

Wie im vorigen Abschnitt schon angemerkt wurde, musste aufgrund der verfügbaren experimentellen Daten der vorgeschlagene baseninduzierte Eliminierungsmechanismus (Abbildung 10 und 18) einer kritischen Betrachtung unterzogen werden. Einerseits konnte wiederholt gezeigt werden, dass durch den Einsatz von stärkeren Basen oder einer höheren Basenkonzentration das Ergebnis der Auxiliar-Abspaltung nicht verbessert werden konnte. Andererseits erschien die Rolle des Phosphins (TCEP), als notwendiges Reagenz zur erfolgreichen Auxiliar-Abspaltung vor dem Hintergrund eines baseninduzierten Mechanismus unklar. Zusätzlich konnten die meisten beobachteten Nebenprodukte nicht mit Hilfe eines anionischen Mechanismus erklärt werden. Dies trifft insbesondere auf jene Nebenprodukte zu, bei denen nur noch Fragmente des jeweiligen Auxiliars am Peptid zurück blieben. Es wurde vermutet, dass unter den Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung zunächst radikalische Intermediate entstehen und diese anschließend über teils mehrstufige Fragmentierungsreaktionen in die entsprechenden Nebenprodukte (wie **36** und **67**) überführt werden. Anhand der beobachteten Aldehyd-Peptidspezies **68** konnte zudem geschlussfolgert

werden, dass prinzipiell eine Entfernung der Thiol-Funktion am Auxiliar in Gegenwart von TCEP und Morpholin erfolgen musste. In diesem Zusammenhang erschien die Möglichkeit einer radikalischen Entschwefelung, welche bekannterweise in Gegenwart von TCEP erfolgt (Kapitel 2.2.2), plausibel. Im Gegensatz zur gezielten Entschwefelung, welche im Rahmen der ENCL genutzt wird, verläuft die Abspaltung der Auxiliare jedoch unter basischen Bedingungen und in Abwesenheit eines geeigneten Wasserstoff-Donors. Demzufolge müsste die radikalische Entschwefelung das Alkylradikal **73** liefern (Abbildung 23), welches aufgrund der eher geringen Stabilität und in Abwesenheit eines potentiellen Wasserstoff-Donors möglicherweise einer intramolekularen Folgereaktion unterliegen sollte. Es wurde in Erwägung gezogen, dass im nächsten Schritt eine β -Fragmentierung des Kohlenstoff-zentrierten Radikals erfolgt und auf diesem Weg das Auxiliar vom Peptidrückgrat abgelöst wird. Das dabei gebildete Amid-Radikal **75** könnte durch Reaktion mit Morpholin in das native Peptid **76** überführt werden.^[89] Auch wenn ein radikalischer Fragmentierungsmechanismus am 6NP-Auxiliar auf anderem Weg erfolgen müsste, wurde aufgrund dieser Überlegungen der Einfluss des Radikalfängers 2, 2, 6, 6-Tetramethyl-piperidin-N-oxyl (TEMPO) auf die Abspaltungsreaktion beider Nitrophenyl-Auxiliare untersucht. Dazu wurden die Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte **23c** und **64G** in einer wässrigen Lösung

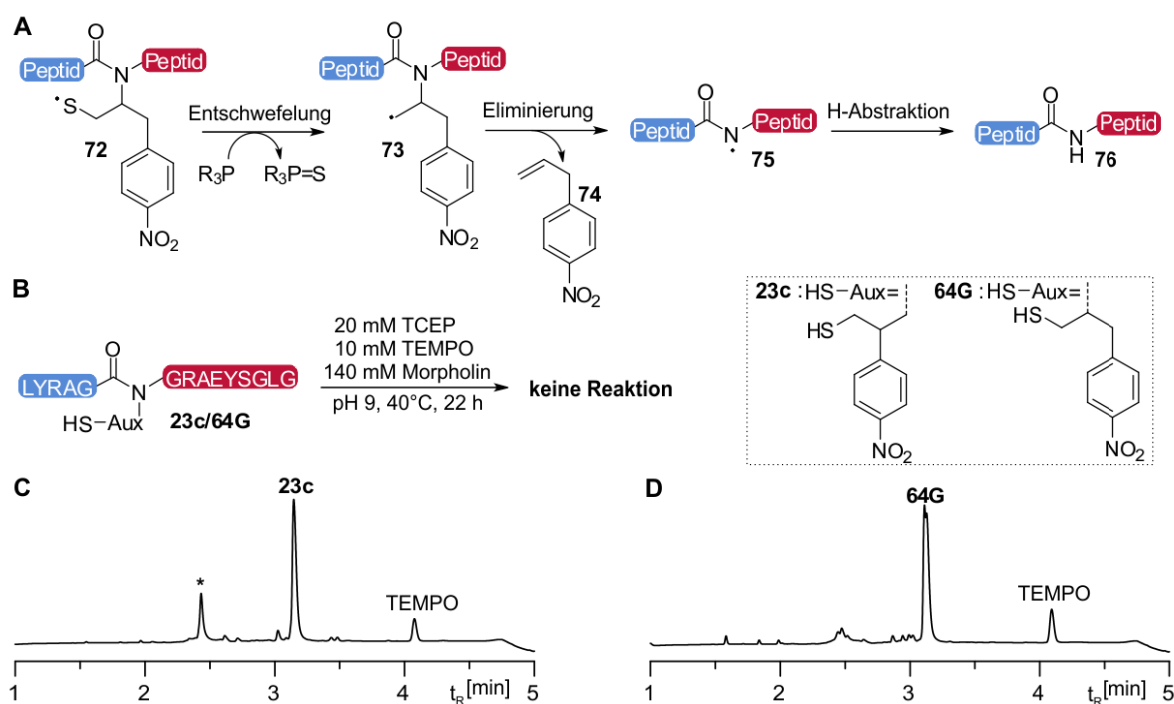


Abbildung 23: Möglicher radikalischer Mechanismus zur Abspaltung des 5NP-Auxiliars (A). In Gegenwart des Radikalfängers TEMPO konnte keine Abspaltung des 5NP- und 6NP-Auxiliars beobachtet werden (B-D). *: Unbekanntes Reaktionsprodukt.

von TCEP (20 mM) und Morpholin (140 mM) in Gegenwart von TEMPO (10 mM) bei 40°C inkubiert. Mit Hilfe der UPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen die Bildung des nativen Peptids nicht erfolgte und damit die Auxiliar-Abspaltung durch TEMPO verhindert wird. Unter Annahme des in Abbildung 23 dargestellten hypothetischen Mechanismus, müsste die Abspaltung des 5NP-Auxiliars durch eine radikalische Entschwefelung initiiert werden.

Das dazu benötigte Thiyl-Radikal **72** könnte möglicherweise in Gegenwart von TEMPO abgefangen (Addukt-Bildung) oder reduziert (Bildung des Thiolats) werden. In beiden Fällen sollte die Entschwefelungsreaktion verhindert werden und dadurch keine Entfernung des Auxiliars erfolgen. Da in diesen Experimenten keine TEMPO-Addukte nachgewiesen werden konnten, kann jedoch keine Aussage getroffen werden auf welchem Weg die Auxiliar-Abspaltung durch TEMPO gestoppt wird. Es ist nicht auszuschließen, dass die gesuchten TEMPO-Addukte aufgrund deren geringer Stabilität^[90] mit Hilfe der UPLC-MS- und MALDI-Analyse nicht detektiert werden konnten. Anhand dieser Überlegungen und der verfügbaren Daten wurde angenommen, dass die Auxiliar-Abspaltung vermutlich über einen radikalischen Mechanismus erfolgt.

4.1.10. Zusammenfassung des Kapitels 4.1

Im ersten Teil der Arbeit konnte die Synthese der 2-Elektronenakzeptor-substituierten-3-Mercapto-prop-1-yl-Auxiliarpeptide und deren erfolgreicher Einsatz in ENCL-Reaktionen gezeigt werden. Im Anschluss wurde die Abspaltung der Auxiliare an den gereinigten Ligationsprodukten getestet. Im Vergleich zu dem Phenylsulfonyl- und Nitril-Auxiliar (**1a** und **1c**) erfolgte die Reaktion am 6NP-Auxiliar **1c** besonders selektiv. Durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte die Selektivität der Abspaltung an diesem Auxiliar weiter gesteigert werden und dabei das native Zielpeptid **30** in einer Ausbeute von 46% isoliert werden. Um eine zeitaufwendige Reinigung des Ligationsproduktes zu vermeiden wurde eine effiziente Eintopfvariante entwickelt, wobei die Abspaltung des 6NP-Auxiliars direkt im Anschluss an die Peptidligation erfolgt. Neben dem verringerten Zeitaufwand ermöglichte die zweistufige Reaktionsführung eine Steigerung der Gesamtausbeute (26%→50%). Im zweiten Teil dieses Kapitels, wurde die Anwendung des 5NP-Auxiliars **1d** untersucht. Zur Synthese

der benötigten Auxiliarpeptide wurde das *S*-*t*Bu-geschützte Keton **57** eingesetzt, welches im letzten Schritt des SPPS durch reduktive Aminierung auf das Harz-gebundenen Modellpeptids gekuppelt wurde. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Reaktivität der beiden Nitrophenyl-substituierten Auxiliare in ENCL-Reaktionen. Dabei zeigte sich, dass die Verknüpfungsreaktionen am 6-ringbildenden Grundgerüst deutlich schneller verlaufen als am 5NP-Auxiliar. Es wurde vermutet, dass die geringere Reaktivität des 5NP-Auxiliars auf den sterischen Anspruch des tertiären α -Kohlenstoff des Auxiliars zurückzuführen ist. Im letzten Teil des Abschnitts konnte die erfolgreiche Abspaltung des 5NP-Auxiliars in Gegenwart von TCEP und Morpholin gezeigt werden. Es wurde vermutet, dass die Auxiliar-Abspaltung nicht über einen baseninduzierten anionischen Mechanismus erfolgt, sondern eher über radikalische Intermediate verläuft. Diese Hypothese konnten durch den Einsatz von TEMPO als Radikalfänger experimentell gestützt werden.

Zusammenfassend konnte erstmals die Synthese nativer Peptide durch die Anwendung der basenlabilen 5NP- und 6NP-Auxiliare demonstriert werden. Im Vergleich zu den häufig verwendeten säurelabilen Auxiliaren, könnten die milden basischen Bedingungen für die Synthese säureempfindlicher Zielproteine (Glykoproteine, sulfatierte und phosphorylierte Proteine)^[19, 91] von Vorteil sein. Zusätzlich sollte die Möglichkeit zur Abspaltung des Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation, zu einer bevorzugten Anwendung dieser ENCL-Methode für komplexe Proteinsynthesen führen, wie es auch für die Ligation-Entschwefelungsstrategie beobachtet wurde. Da die beiden entwickelten Auxiliare jedoch auf mindestens einen Glycin-Rest an der Verknüpfungstelle angewiesen sind,^[87-88] muss festgehalten werden, dass die Reichweite der Auxiliar-vermittelten Peptidligation zu diesem Zeitpunkt noch nicht entscheidend verbessert werden konnte.

4.2. Radikalisch spaltbare N^α -Auxiliare für die ENCL

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1 lieferten wertvolle Informationen, auf welchem Weg eine Verbesserung der N^α -Auxiliare erfolgen könnte. Einerseits wurde festgestellt, dass Verknüpfungsreaktionen besonders rasch verlaufen, sofern eine α -positionierte CH_2 -Gruppe den sterischen Anspruch des an der Peptidligation beteiligten sekundären Amins möglichst gering hält. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Reichweite von N^α -Auxiliaren auf einfache glycinhaltige Ligationsstellen beschränkt bleibt, sofern die Verknüpfungsreaktionen über einen 6-gliedrigen Übergangszustand verlaufen. Wichtiger war jedoch die Erkenntnis, dass eine selektive Auxiliar-Abspaltung womöglich über eine radikalisch initiierte β -Fragmentierung gelingen könnte. Anhand dieser Informationen wurde das Konzept der 2'-substituierten 2-Mercaptoethyl-Auxiliare (**1e-g**) entwickelt (Abbildung 24). Diese Auxiliare vermitteln die Peptidverknüpfung über einen günstigen 5-gliedrigen Übergangszustand und vermeiden α -Verzweigung am N-terminalen Amin. Diese beiden Strukturmerkmale sollten die Voraussetzung für einen besonders effizienten $N \rightarrow S$ Acyltransfer schaffen und folglich schnelle Verknüpfungsreaktionen ermöglichen. Die Abspaltung der 2'-substituierten 2-Mercaptoethyl-Auxiliare würde durch eine radikalische Entschwefelung eingeleitet werden

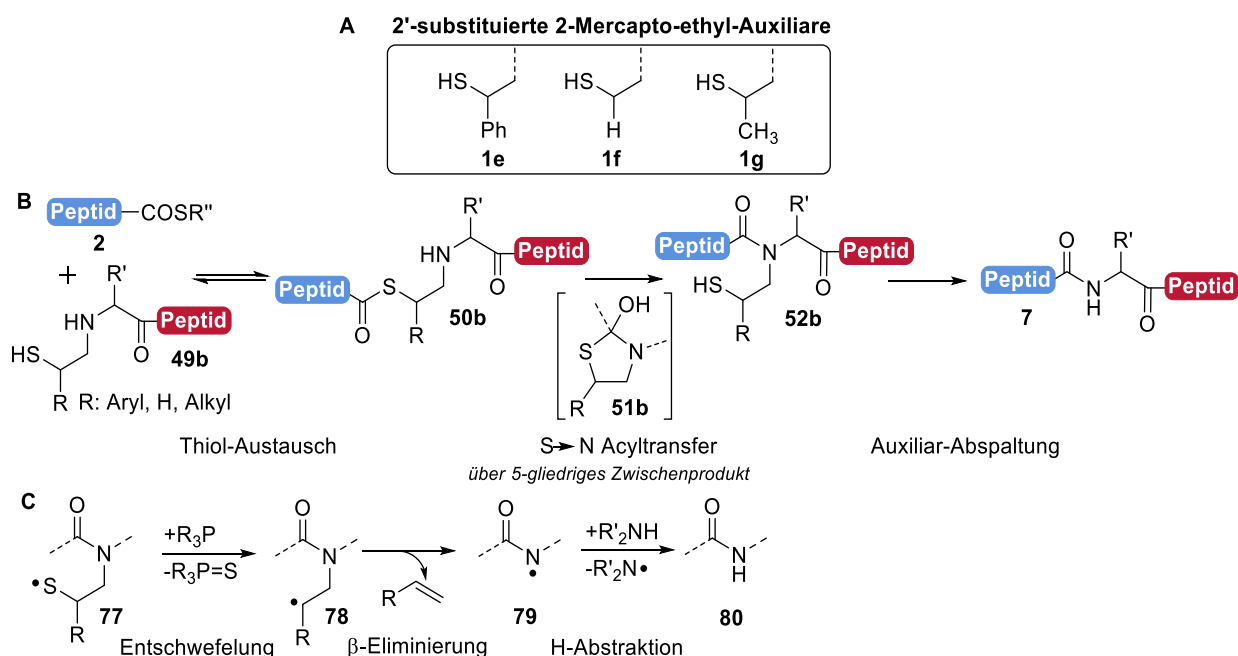


Abbildung 24: Chemische Strukturen (A) und Konzept (B-C) der 2'-substituierten 2-Mercaptoethyl-Auxiliare für die ENCL: Die Peptidligationen erfolgen über ein 5-gliedriges Zwischenprodukt **51b**. Durch radikalische Entschwefelung und anschließender β -Eliminierung wird das Auxiliar vom Peptid abgelöst. Das native Peptid **80** wird durch nachfolgende H-Abstraktion erhalten.

(Abbildung 24C). Es wurde angenommen, dass durch Einwirkung von Licht (Photolyse) oder Sauerstoff (Oxidation) die Bildung des benötigten Thiyl-Radikals **77** erfolgen sollte. Analog zur Ligations-Entschwefelungs-Strategie (Abschnitt 2.2.2) müsste das Thiyl-Radikal **77** in Gegenwart von Phosphinen rasch in das entsprechende Kohlenstoff-zentrierte Radikal **78** überführt werden. In Abhängigkeit des benachbarten Substituenten würde das radikalische Intermediat eine eher hohe ($R = \text{Aryl}$) oder geringe ($R = \text{H}$) Stabilität aufweisen. In Abwesenheit eines geeigneten H-Donors sollte im Anschluss eine β -Fragmentierung zur Entstehung des Amidradikal **79** und Styrol führen. Den Berechnungen nach *Hioe et al.* zur Folge, müsste das instabile Amidradikal **79** in Gegenwart von sekundären Aminen zügig in das native Peptid **80** überführt werden.^[89]

4.2.1. Synthese der 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliarpeptide

Um die mögliche Anwendbarkeit der 2'-substituierten 2-Mercaptoethyl-Auxiliare **1e-g** zu überprüfen, konzentrierten sich erste Arbeiten auf das Phenyl-substituierte Grundgerüst **1e**. Es wurde vermutet, dass der Phenyl-Substituent eine besonders rasche Entschwefelung der benachbarten Thiol-Funktion ermöglichen könnte, da in diesem Fall ein stabiles Benzylradikal gebildet würde. Die Bildung von Styrol (konjugiertes π -Systems) sollte dabei die gewünschte Reaktion zusätzlich begünstigen. Mit dem Ziel eine einfache Synthese unterschiedlicher Auxiliarpeptide zu ermöglichen, sollte die Einführung des Auxiliars im letzten Schritt der SPPS, durch reduktive Aminierung des Dmt-S-geschützten Aldehyds **83** mit der jeweiligen N-terminalen Aminosäure des Harz-gebundenen Peptids, erfolgen (Abbildung 25). Die Synthese des Auxiliar-Vorläufermoleküls **83** gelang ausgehend von Phenylelessigsäure, welche zunächst unter Lichteinstrahlung mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) an der Benzylposition bromiert wurde. Die anschließende Reaktion mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und *N*, *O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid lieferte das gewünschte Weinrebamid **81** in 47% Ausbeute über zwei Stufen. Im nächsten Schritt erfolgte die Einführung der Ethylxanthogenat-Gruppe, welche durch nachfolgende Aminolyse in das entsprechende Thiol **82** überführt wurde (75% Ausbeute über zwei Stufen). Die Alkylierung der Mercapto-Funktion mit Dmt-Cl lieferte den Thioether in 82% Ausbeute. Durch Reduktion des Weinrebamids mit Lithiumaluminiumhydrid konnte schließlich der gewünschte S-Dmt-geschützte Aldehyd **83** erhalten (80% Ausbeute) werden.

Als nächstes wurde die Anwendung des Aldehyds **83** für die Synthese von Auxiliärpeptiden an dem Harz-gebundenen Glycin-Modellpeptid **58G** untersucht. Durch Verwendung eines Überschusses (je 15 Äq.) an Aldehyd **83** und NaCNBH_3 in einem Gemisch aus DMF, Methanol, TMOF und Essigsäure konnte ein nahezu vollständiger Umsatz (>95%) des Startmaterials erreicht werden (Abbildung 25D'). Neben dem gewünschten Auxiliärpeptid **84G** als Hauptprodukt, konnte mit Hilfe der HPLC-Analyse geringe Mengen der *N*-Formyl-Peptidspezies **42** nachgewiesen werden, welche vermutlich aus einer Reaktion des Startmaterials und TMOF resultiert. Zusätzlich deuteten die geringen Mengen der *N*-Methyl-Peptidspezies **85** auf eine Verunreinigung der Lösungsmittel (DMF, TMOF oder Methanol) durch Formaldehyd hin, was unter den Bedingungen der reduktiven Aminierung die Bildung des methylierten Nebenproduktes **85** erklären würde. Um die Entstehung der genannten

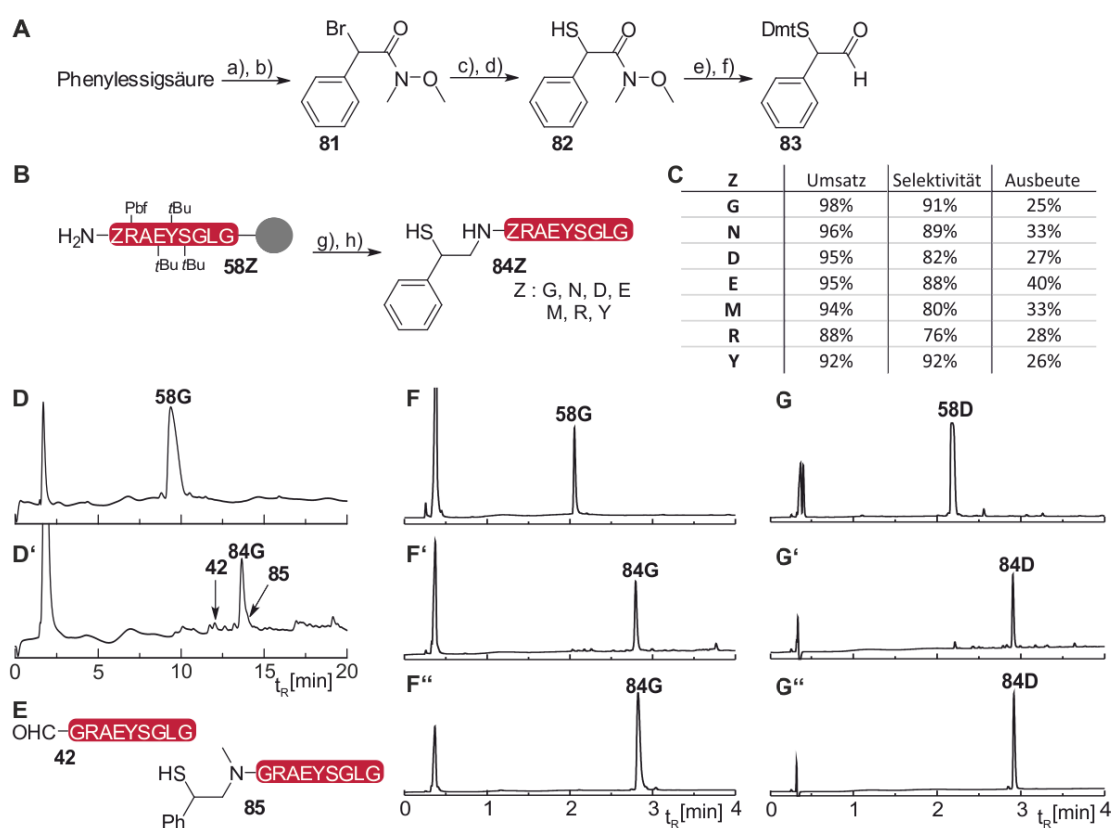


Abbildung 25: Synthese und Anwendung des *S*-Dmt-geschützten Aldehyds **83** für die Synthese der Auxiliärpeptide **84Z** (A-B). Tabellarische Übersicht (C): Umsatz und Selektivität der reduktiven Aminierung sowie isolierte Ausbeute der Auxiliärpeptide **84Z**. HPLC-Chromatogramme der nach der TFA-Behandlung erhaltenen Rohprodukte vor (D) und nach (D') der reduktiven Aminierung (Reaktion in einem Gemisch aus MeOH, DMF, TMOF und AcOH). UPLC-Chromatogramme der nach der TFA-Behandlung erhaltenen Rohprodukte vor (F, G) und nach (F', G') der reduktiven Aminierung (Reaktion in einem Gemisch aus NMP, *i*PrOH, und AcOH) sowie der gereinigten Auxiliärpeptide **66G** (F'') und **66D** (G''). Bedingungen: a) NBS, Bestrahlung, CCl_4 , RT, (b) N, O $\text{HNMeOMe}^+\text{HCl}$, EDC, NEt_3 , DCM, RT, 47% (über zwei Stufen); (c) EtOCSK, Aceton, RT; (d) Piperidin, DCM, RT, 75% (über zwei Stufen); (e) DMTTrCl, DIPEA, DCM, RT, 82%; (f) LiAlH_4 , THF, -78°C, 80%; (g) **65**, NaCNBH_3 , AcOH, NMP, MeOH, RT; (h) TFA/TIS/Wasser, RT, 25-40% (über zwei Stufen).

Nebenprodukte zu verhindern, wurde die Reaktion in einem Gemisch aus NMP, Isopropanol und Essigsäure durchgeführt. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Einführung des Auxiliars deutlich selektiver (68% in Gemisch aus DMF, MeOH, TMOF; 91% in Gemisch aus NMP, *i*PrOH) und ermöglichte die Synthese des Auxiliarpeptids in akzeptabler Ausbeute (25%, Tabelle in Abbildung 25C). Hierbei ist anzumerken, dass der Umsatz der reduktiven Aminierung durch eine Erhöhung des Überschusses (30 Äq.) an NaCNBH_3 deutlich verringert wurde und eine sequentielle Reaktionsführung (spätere Zugabe des Reduktionsmittels) mit erheblichen Nebenreaktionen einherging. Das optimierte Protokoll der reduktiven Aminierung auf der Festphase wurde anschließend an Modellpeptiden **84X** mit unterschiedlichen N-terminalen Aminosäure (X = N, D, E, M, R, Y) getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die reduktive Aminierung stets mit hohem Umsatz des Startmaterials (88-96%) und weitgehend frei von Nebenreaktionen (Selektivität 76-92%) erfolgte (Tabelle in Abbildung 25C). Selbst in Gegenwart sterisch anspruchsvoller Seitenketten (beispielsweise Trt-Schutzgruppe an Asparaginsäure, Abbildung 25F') verlief die Reaktion nahezu vollständig (95% Umsatz) und mit ausreichend hoher Selektivität (82%). In den erhaltenen Rohprodukten konnte neben den gewünschten Auxiliarpeptiden stets geringe Mengen unterschiedlicher Nebenprodukte nachgewiesen werden. Die MS-Analyse deutet darauf hin, dass diese Verunreinigungen durch Methylierung, Acetylierung, Dehydratisierung aber auch Oxidation der Auxiliarpeptide gebildet werden. Durch Anwendung einer präparativen HPLC-Reinigung wurden die Nebenprodukte abgetrennt und die gewünschten Auxiliarpeptide **84X** in hoher Reinheit (>95%) erhalten (isolierte Ausbeute: 25-40%).

4.2.2. Anwendung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Im nächsten Schritt wurde die Reaktivität des 2-Mercapto-2-phenethyl-Auxiliars (Abkürzung: 2MPE-Auxiliar; **1e**) in ENCL-Reaktionen untersucht. Um einen Vergleich zu den zuvor untersuchten basenlabilen-Auxiliaren zu ermöglichen, erfolgte zuerst der Einsatz des Glycinauxiliarpeptids **84G** an Gly-Gly-, Ala-Gly- und Leu-Gly-Verknüpfungsstellen. Dazu wurde das Auxiliarpeptid **84G** im Ligationspuffer mit den jeweiligen Peptidthioestern **22G**, **22A** und **22L** zur Reaktion gebracht. Hierbei zeigte sich wiederholt, dass die Verknüpfungsreaktionen mit steigendem sterischen Anspruch der C-terminalen Aminosäure des Peptidthioesters zunehmend langsamer erfolgten. Im Fall der Gly-Gly-Ligation lieferte

das 2MPE-Auxiliar in nur 5 Minuten einen Ausbeute von 50% ($t_{50} = 5$ min) und ermöglicht demzufolge deutlich schnellere Reaktionen als das 5NP-Auxiliar ($t_{50} = 14$ min). Im Vergleich mit dem 6NP-Auxiliar ($t_{50} = 4$ min) erscheint die Reaktivität des 2MPE-Auxiliar an dieser Verknüpfungsstelle identisch (Abbildung 26B). Dieser Trend änderte sich, sobald sterisch anspruchsvolle Peptidthioester verwendet wurden. Die Analyse der Ala-Gly-Peptidligation

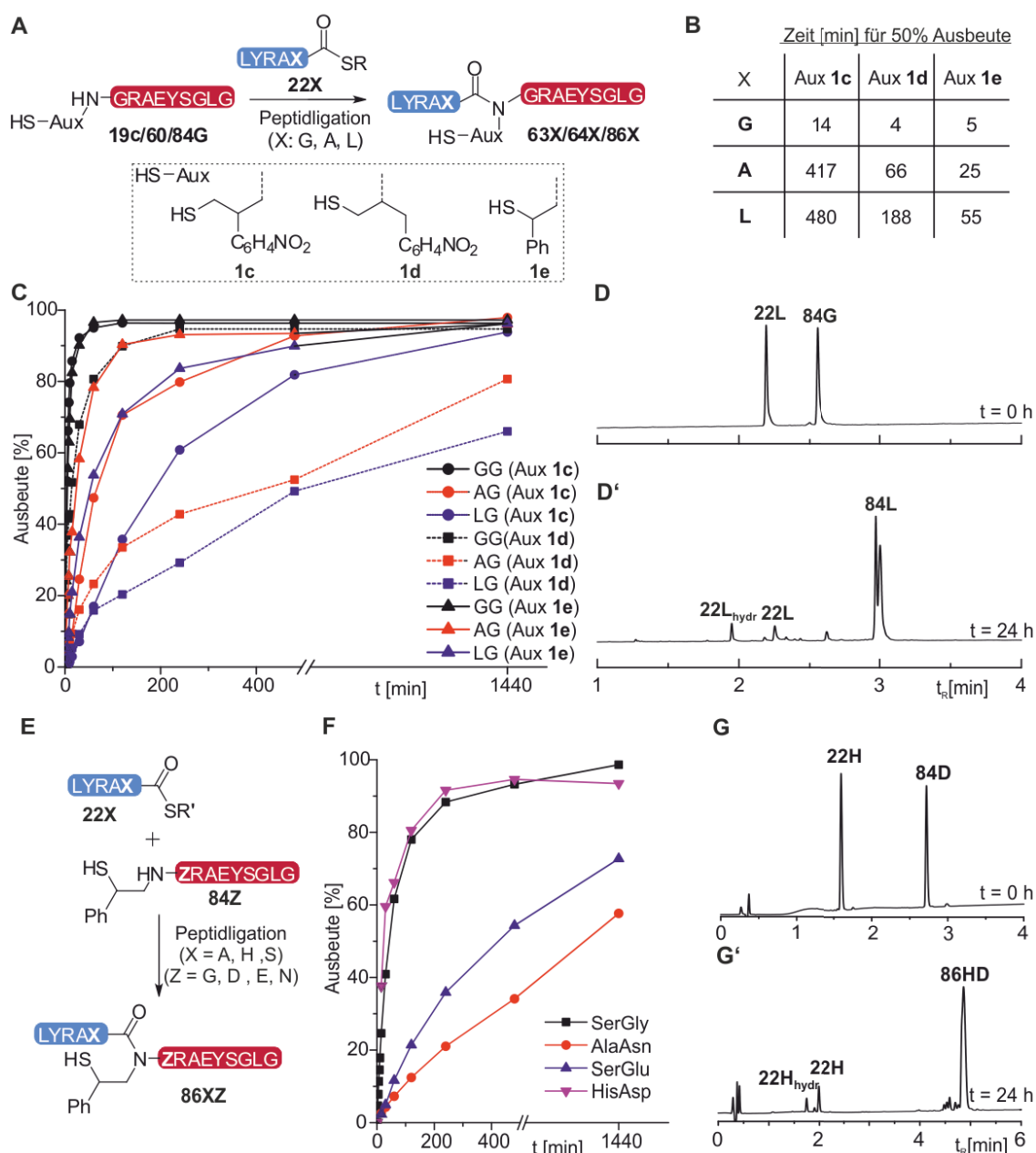


Abbildung 26: Vergleich der Auxiliare 1c-e in ENCL Reaktionen (A). Ermittelte t_{50} -Werte (Zeit für 50% Ausbeute) und zeitlicher Verlauf der Peptidligationen (B-C). UPLC-Analyse vor (D) und nach (D') der Peptidligation des Thioesters 22L mit Auxiliärpeptid 84G. Anwendung des 2MPE-Auxiliars 1e an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsstellen (E). Zeitlicher Verlauf (F) der Peptidligationen aus Abbildung E. UPLC-Analyse vor (G) und nach (G') der Peptidligation des Thioesters 22H mit Auxiliärpeptid 84D. Peptidligationen erfolgen in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5, c(Peptide) = 5 mM) bei RT. 22L_{hydro}/22H_{hydro}: Hydrolyse des Peptidthioesters 22L/22H; 84L erscheint als Doppelpeak aufgrund der Auftrennung der Diastereomere.

ergab, dass durch Anwendung des 2MPE-Auxiliars bereits nach 25 Minuten eine Ausbeute von 50% erreicht wurde. Im Vergleich dazu benötigte das 6NP-Auxiliar mehr als die doppelte ($t_{50} = 66$ min) und die 5-ringbildende Variante mehr als die 16-fache Zeit ($t_{50} = 417$ min). Eine Verbesserung der bisher erzielten Ergebnisse konnte ebenfalls an der Leu-Gly-Verknüpfungsstelle bestätigt werden. Hierbei wurde das Leu-Gly-Ligationsprodukt nach 55 Minuten in 50% Ausbeute erhalten, womit das 2MPE-Auxiliar eine 3-bis 9-fache höhere Reaktivität als die 6NP- und 5NP-Auxiliare aufweist. Anschließend wurde der Einsatz des 2MPE-Auxiliars an anspruchsvollen Verknüpfungsstellen untersucht, welche keinen Glycin-Rest an der Ligationsstelle besitzen (Abbildung 26E). Die Asp-His-Ligation verlief rasch und ermöglichte innerhalb von nur vier Stunden mehr als 90% Ausbeute. Aber auch andere schwierige Verknüpfungsreaktionen, wie Ala-Asn und Ser-Glu-Ligationen, ergaben über 50% Produkt in nur 8-24 h, obwohl die Reaktionen mit unreaktiven Alkylpeptidthioestern durchgeführt wurden. Damit stand erstmals ein N^{α} -Auxiliar für die ENCL zur Verfügung, welches nicht auf glycinhaltige Verknüpfungsstellen beschränkt ist. Zusätzlich konnte anhand der verfügbaren Daten folgende Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen von N^{α} -Auxiliaren abgeleitet werden: 1.) Auxiliar-vermittelte Peptidligationen erfolgen besonders schnell, wenn sie über einen 5-gliedrigen Übergangszustand verlaufen und der sterische Anspruch des α -Kohlenstoffes, in Form einer CH_2 -Gruppe, möglichst gering gehalten wird; 2.) die Reichweite von 5-ringbildenden N^{α} -Auxiliaren bleibt auf glycinhaltige Ligationsstellen beschränkt, sobald eine Verzweigung am α -Kohlenstoff vorhanden ist; 3.) erfolgt die Peptidligation über einen 6-gliedrigen Übergangszustand, muss ebenfalls mindestens ein Glycin-Rest an der Verknüpfungsstelle vorhanden sein, um eine erfolgreiche Peptidligation zu ermöglichen. Diese Limitierung kann selbst durch flexible α - CH_2 -Gruppen nicht aufgehoben werden.

4.2.3. Abspaltung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars

Nachdem die vergleichsweise hohe Leistungsfähigkeit des 2MPE-Grundgerüsts in ENCL-Reaktionen gezeigt werden konnte, wurde die Abspaltung des Auxiliars an dem gereinigten Gly-Gly-Ligationsprodukt **86GG** untersucht (Abbildung 27). Dem postulierten radikalischen Mechanismus zur Folge, sollte die Gegenwart eines Phosphins und Thiyl-Radikals ausreichen, um die Entschwefelungsreaktion und somit die Abspaltung des Auxiliars zu ermöglichen. Die Bildung von Thiyl-Radikalen müsste bekanntermaßen in Gegenwart von Sauerstoff und in

leicht sauren bis basischen wässrigen Puffern gelingen.^[92] Aufgrund dieser Informationen wurde zu Beginn die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars in wässrigen TCEP-Lösungen (20 mM) bei unterschiedlichen pH-Wert erprobt. Dazu wurde das gereinigte Ligationsprodukt in einer wässrigen TCEP-Lösung (20 mM) gelöst, der gewünschte pH-Wert (4.5-10) durch Zugabe von Morpholin eingestellt und das Reaktionsgemisch auf 50°C erhitzt. Nach 24 h konnte mit Hilfe der HPLC-MS-Analyse gezeigt werden, dass im sauren Milieu (45 mM Morpholin; pH 4.5) kein Umsatz des Startmaterials erfolgte (Abbildung 27B). Im Gegensatz dazu, wurde unter basischen Bedingungen (90 mM Morpholin; pH 8.5) die Bildung des gewünschten nativen Peptids **30** und ein nahezu vollständiger Umsatz des Startmaterials beobachtet (Abbildung 27C). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem vorgeschlagenen, radikalischen Mechanismus, da die Erzeugung des Thiyl-Radikals bevorzugt über eine Thiolat-Spezies erfolgt und diese erst unter ausreichend hohem pH-Wert generiert wird. Interessanterweise lieferte die Reaktion bei höherer Morpholin-Konzentration (180 mM, pH 9.5) jedoch eine geringere Ausbeute des Zielpeptids **30** (Abbildung 27D). Im nächsten Schritt wurde der Einsatz verschiedener Basen in der Auxiliar-Abspaltung untersucht. Dabei wurden primäre(*tert*-Butylamin, Anilin), sekundäre (Dimethylamin, Piperidin) und tertiäre Amine

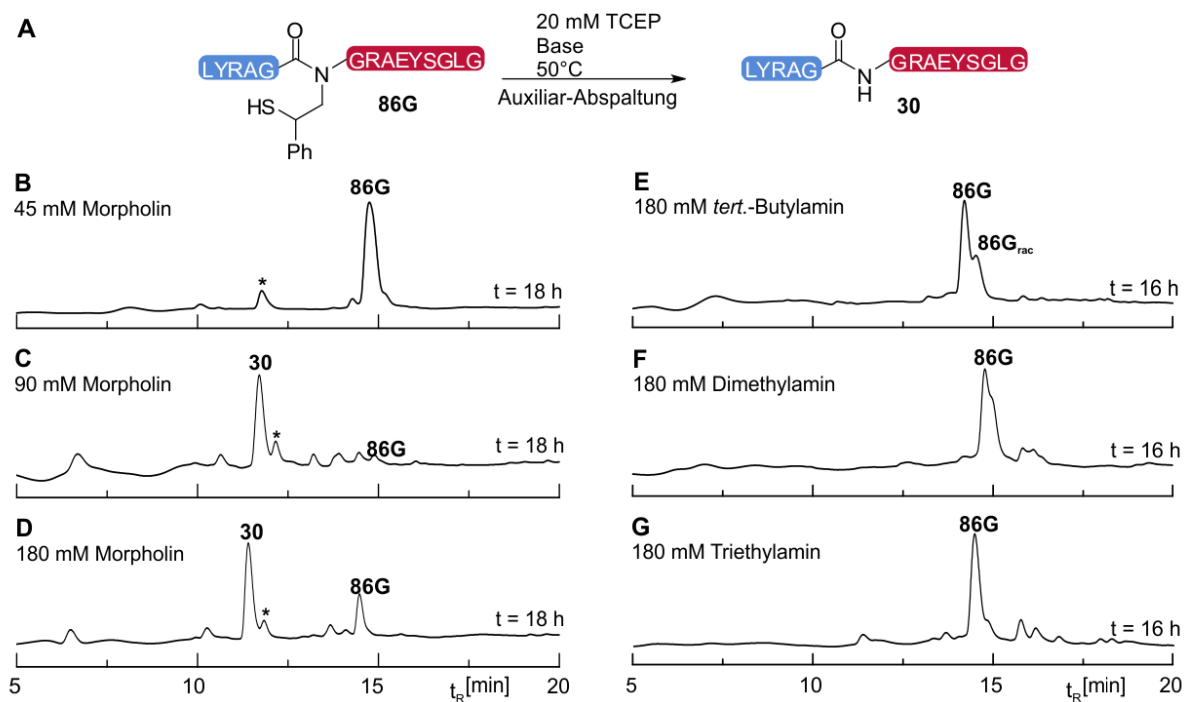


Abbildung 27: Versuche zur Abspaltung des 2MPE-Auxiliars (A): UPLC-Analysen nach 16-18 h Reaktionszeit unter den angegebenen Bedingungen (B-G). Die Experimente wurden bei einer Peptidkonzentration von 0.5 mM durchgeführt. *: Verunreinigung des Startmaterials; **86G_{rac}**: Racemisierung des Ligationsproduktes **86G**.

(Triethylamin) verwendet. Hierbei wurde festgestellt, dass die Auxiliar-Abspaltung ausschließlich in Gegenwart von Morpholin erfolgte (Abbildung 27E-G). Diese Beobachtung kann mit Hilfe zweier unterschiedlicher Ansätze erklärt werden: 1.) Die Reaktion erfolgt nur in einem bestimmten pH-Bereich (pH-Abhängigkeit), welcher durch den pK_s -Wert von Morpholin optimal erfasst wird; 2.) Das sekundäre Amin reagiert, wie angenommen (siehe Abbildung 24C), als Radikalfänger und kann nur im Fall von Morpholin geeignet stabilisiert werden. Demnach wäre jedoch zumindest eine erfolgreiche Abspaltung des Auxiliars in Gegenwart von Piperidin zu erwarten gewesen, da die Stickstoff-zentrierten Radikale von Morpholin (-47.8 kJ/mol) und Piperidin (-49.7 kJ/mol) ähnlich stabil sind.^[89] Aus diesem Grund erscheint der Einfluss des pK_s -Wertes in dieser Versuchsreihe wohl eher der entscheidende Faktor zu sein. Dieser unterscheidet sich im Fall von Morpholin ($pK_s = 8.4$)^[83] und Piperidin ($pK_s = 11.2$)^[83] deutlich und könnte dadurch den Erfolg einer pH-Wert-abhängigen Reaktion beeinflusst haben.

Anschließend wurde versucht, die Selektivität der Reaktion durch eine Erhöhung der TCEP- und Morpholin-Konzentration zu optimieren (Abbildung 28). Dazu wurde das Ligationsprodukt mit wässrigen Lösungen unterschiedlicher TCEP- und Morpholin-Konzentration ($c(\text{TCEP}) = 0.02\text{--}0.4\text{ M}$; $c(\text{Morpholin}) = 0.08\text{--}1.6\text{ M}$) behandelt. Durch die Verwendung einer vierfachen Konzentration an Morpholin, in Bezug auf die TCEP-Konzentration, wurde der zuvor als optimal ermittelte pH-Wert von 8.5 beibehalten. Zusätzlich wurden einige Experimente bei 25°C und 40°C durchgeführt, um den Einfluss der Temperatur auf die Auxiliar-Abspaltung zu untersuchen. Mit Hilfe der UPLC-Analyse konnte der zeitliche Verlauf der Auxiliar-Abspaltung verfolgt und die Selektivität der Reaktion (nach 24 h) ermittelt werden. Die Ergebnisse in Abbildung 28 zeigen, dass die Reaktionen bei Raumtemperatur zwar deutlich langsamer verlaufen als bei 40°C, aber dafür eine höhere Selektivität ermöglichten. Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender TCEP/Morpholin-Konzentration zunimmt. Die schnellste Reaktion wurde durch Einsatz von 400 mM TCEP/800 mM Morpholin bei 40°C beobachtet. Unter diesen Bedingungen konnte ein vollständiger Umsatz des Startmaterials in weniger als vier Stunden erreicht werden. Ähnliches gilt auch für die Selektivität der Auxiliar-Abspaltung: Diese erhöht sich zunächst kontinuierlich bei TCEP-Konzentrationen von 20 mM (79%, RT) bis 200 mM (91%, RT). Bei hoher TCEP-Konzentration (400 mM) wurde jedoch zunehmend die Bildung

der *N*-Methyl-Peptidspezies **87** beobachtet, wodurch die Selektivität der Reaktion erniedrigt (83%, RT) wird (Abbildung 28E). Im Gegensatz dazu wird das *N*-Acetophenon-Nebenprodukt **88** nahezu unabhängig von den Reaktionsbedingungen (Temperatur und TCEP/Morpholin-Konzentration) in geringen Mengen (4-5%) gebildet. Wie im späteren Teil der Arbeit (Kapitel 4.2.8.) noch diskutiert wird, resultieren die beiden Nebenprodukte **87** und **88** vermutlich aus einer oxidativen Spaltung des Auxiliars durch Reaktion mit Sauerstoff. Wie schon zuvor

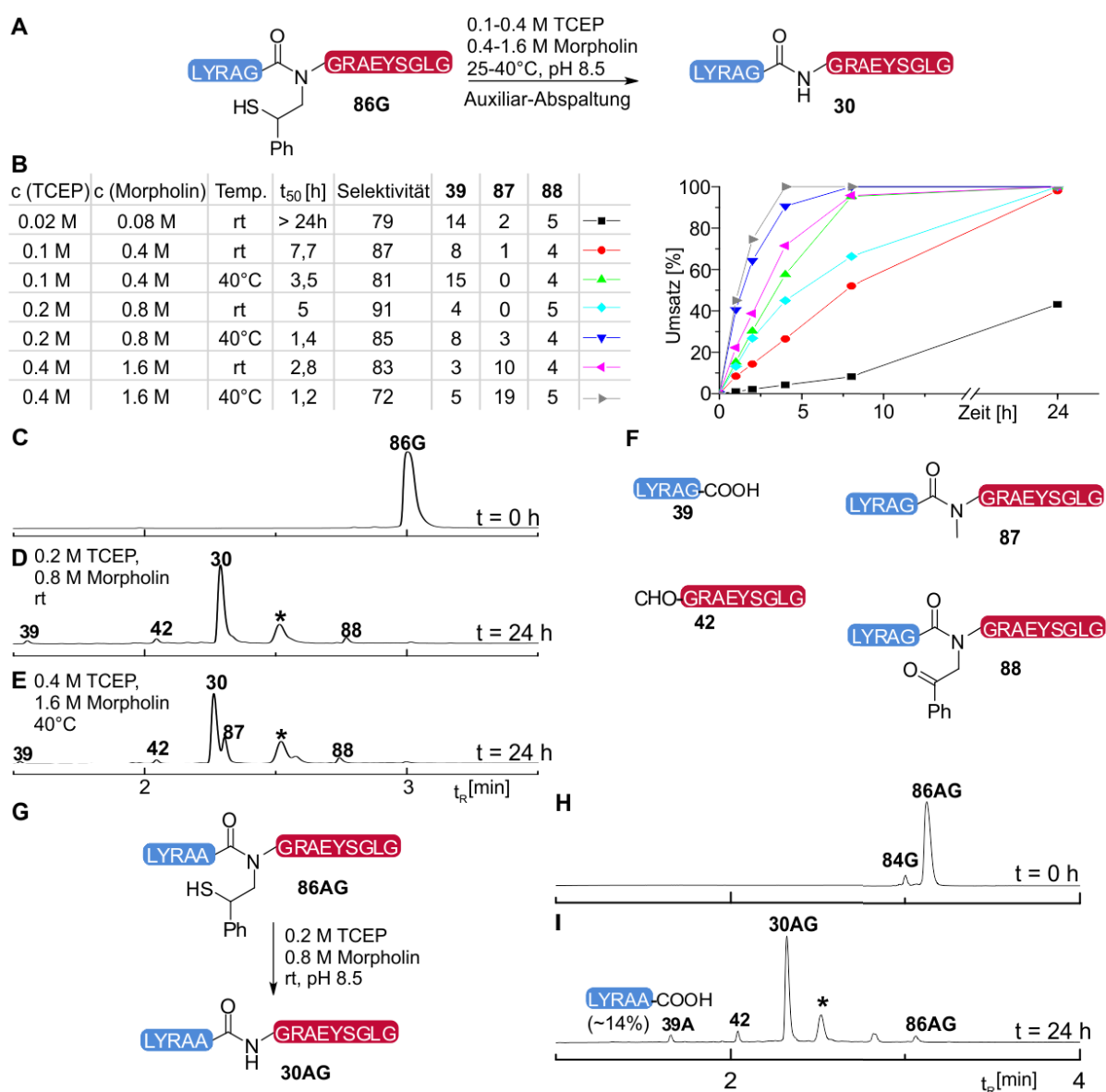


Abbildung 28: Optimierung der Abspaltung des 2MPE-Auxiliars am Ligationsprodukt **86G** (A). Tabellarische und grafische Übersicht: Selektivität der Auxiliar-Abspaltung, t_{50} -Werte (Zeit für 50% Umsatz) und Anteil der Nebenprodukte **39**, **87** und **88** bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sowie der zeitliche Verlauf (Diagramm rechts) der Reaktion (B). UPLC-Analyse vor (C) und nach (D-E) der Abspaltung des Auxiliars am Ligationsprodukt **86G**. Vermutete Strukturen der beobachteten Nebenprodukte **39**, **42**, **87** und **88** (F). Abspaltung des 2MPE-Auxiliars am Ligationsprodukt **86AG** (G) und die dazugehörigen UPLC-Analysen vor (H) und nach (I) der Abspaltung. *: Nicht-peptidisches Material, das im Verlauf der Auxiliar-Abspaltung gebildet wird.

bei der Abspaltung der basenlabilen Auxiliare beobachtet, wurde die Reaktion von der Spaltung der Gly-Gly-Amidbindung begleitet. Die Reaktionsführung bei niedriger Temperatur (25°C) und hoher TCEP-/Morpholin-Konzentration ermöglichte es, diese ungewünschte Nebenreaktion auf 3% zu reduzieren. Um zu untersuchen, ob die Spaltung der Amidbindung durch direkte Hydrolyse der leicht zugänglichen Gly-Gly-Amidbindung oder über ein basenlabiles Thioester-Intermediat erfolgt (Mechanismus analog Abbildung 16L), wurde die Auxiliar-Abspaltung an dem Ala-Gly-verknüpften Ligationsprodukt **86AG** untersucht (Abbildung 28G). An diesem Startmaterial sollte der Angriff eines Nukleophils aufgrund des sterisch anspruchsvollen Alanin-Restes erschwert sein und folglich die direkte Hydrolyse in geringerem Maße auftreten.

Die Abspaltung des Auxiliars (mit 0.2 M TCEP/0.8 M Morpholin, RT) lieferte an diesem Modellpeptid jedoch einen deutlich erhöhten Anteil (14% im Vergleich zu 4% an **86G**) der Peptidfragmente **39A** und **42** (Abbildung 28I). Demzufolge erscheint die Spaltung der Amidbindung wohl eher über einen $N \rightarrow S$ Acytransfer zu verlaufen. Es wurde vermutet, dass der sterische Anspruch im Ala-Gly-verknüpften Ligationsprodukt **86AG** die intramolekulare Umlagerung ($N \rightarrow S$ Acytransfer) begünstigt und dadurch mehr der basenlabilen Thioester-Peptidspezies für die Hydrolyse zur Verfügung steht.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars mit hoher Selektivität (>90%) realisiert werden konnte, sollte anschließend die Reaktion an anspruchsvollen Substraten untersucht werden. Von besonderem Interesse waren hierbei Ligationsprodukte, welche keinen Glycin-Rest an der Verknüpfungsstelle aufweisen, da diese durch bisher verfügbare Methoden der Auxiliar-vermittelten Peptidligation nicht zugänglich waren. Durch Anwendung des 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen konnten die drei Ligationsprodukte **86SE**, **86QF** und **86AN** in reiner Form erhalten werden (siehe Kapitel 6.12.4.). Im Gegensatz zu dem Gly-Gly-Ligationsprodukt **86GG** konnten diese Auxiliar-tragenden Peptide jedoch nicht in wässriger TFA (0.1 Vol.-%) bei -20°C gelagert werden. Unter den sauren Bedingungen erfolgte ein $N \rightarrow S$ Acytransfer unter Bildung der jeweiligen Thioester-verknüpften Peptidspezies. Am Beispiel des Ser-Glu-Ligationsproduktes **86SE** wurde unter diesen Bedingungen bereits nach sechs Stunden eine 1:1-Mischung des Amid- und des Thioester-verknüpften Produktes erhalten (Abbildung 29B''). Das Problem konnte durch Lagerung der Peptide als lyophilisierte Feststoffe umgangen werden. Überraschenderweise lieferte die

Behandlung des verunreinigten Ser-Glu-Startmaterials **86SE**/**86SE*** mit 0.1 M TCEP und 0.4 M Morpholin bei 40°C das gewünschte Zielpeptid **30SE** mit hoher Selektivität und nur geringen Mengen hydrolysierte Peptidfragmente (<10%; Abbildung 29C'). Daraus kann abgeleitet werden, dass unter den basischen Bedingungen eine rasche Umlagerung zum Amid-verknüpften Ligationsprodukt **86SE** stattfindet und anschließend die Entfernung des Auxiliars erfolgt. Zusätzlich sollte die irreversible Auxiliar-Abspaltung das Gleichgewicht auf

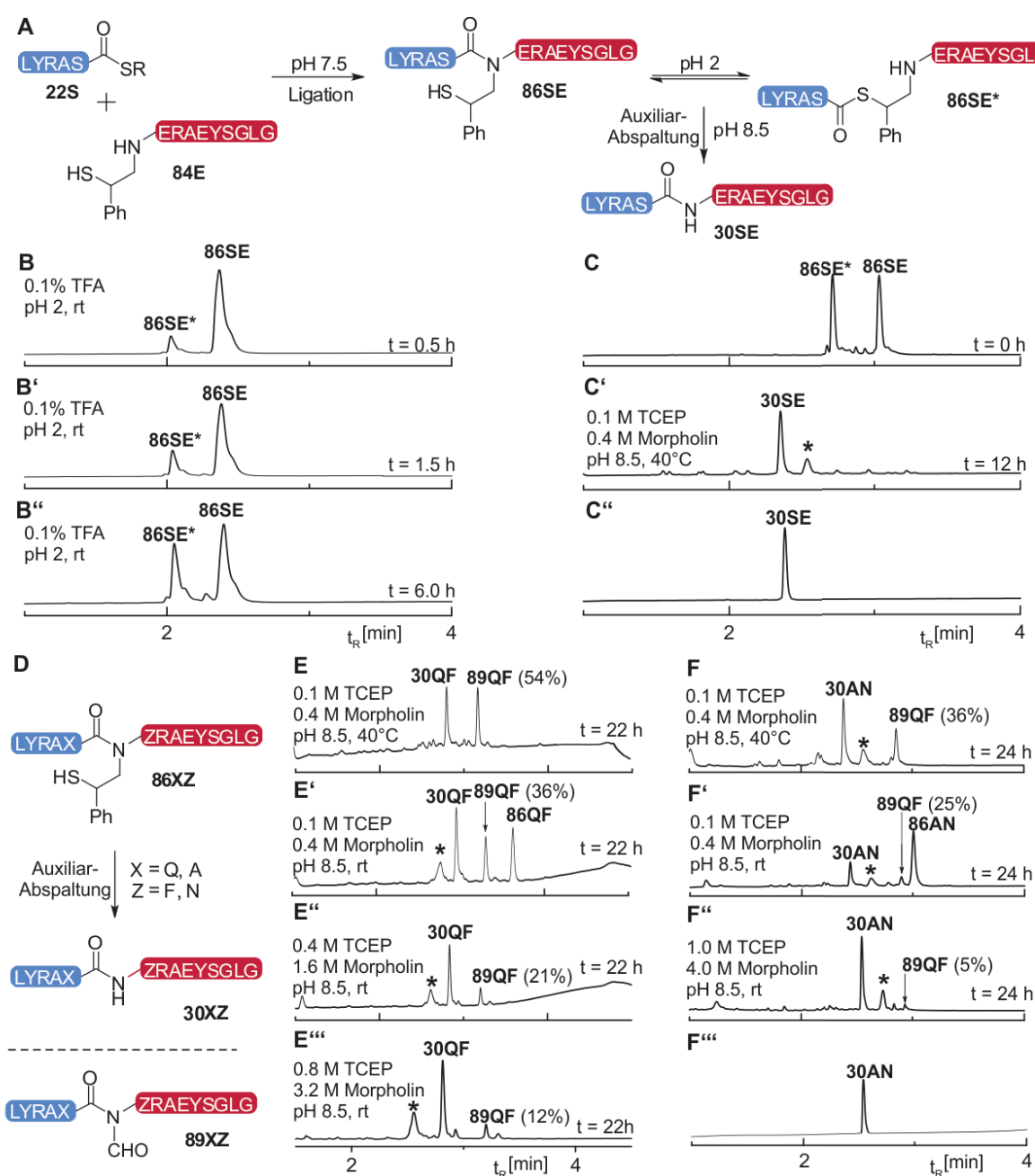


Abbildung 29: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars an Verknüpfungsstellen ohne Glycin (A, D). UPLC-Analyse des S→N-Acyltransfers bei pH 2 (B–B''), der Abspaltung des Auxiliars (C–C', E–E'', F–F'') und der gereinigten Peptide **30SE** (C'') bzw. **30AN** (F''). *: Nicht-peptidisches Material, welches im Verlauf der Auxiliar-Abspaltung gebildet wird.

die Seite des tertiären Amids **86SE** verschieben. Durch eine anschließende HPLC-Reinigung des Rohproduktes konnte das gewünschte Zielpeptid **30SE** mit 38% Ausbeute und in hoher Reinheit isoliert werden. Im Gegensatz dazu erwies sich die selektive Entfernung des 2MP-Auxiliars am Gln-Phe-Ligationsprodukt **86QF** problematisch. Die UPLC-Analyse zeigte (Abbildung 29E), dass nach 22 h in Gegenwart von 0.1 M TCEP und 0.4 M Morpholin das *N*-Formyl-Nebenprodukt **89QF** als Hauptprodukt (54%) gebildet wurde. Erst durch den Einsatz niedriger Temperaturen (40°→rt) und hoher TCEP- und Morpholin-Konzentration ($c(\text{TCEP}) = 0.8 \text{ M}$; $c(\text{Morpholin}) = 3.2 \text{ M}$, pH 8.5) konnte der Anteil der *N*-Formyl-Peptidspezies **89QF** auf unter 12% reduziert werden.

Ein ähnliches Verhalten wurde an dem Ala-Asn-verknüpften Ligationsprodukt **86AN** beobachtet. Bei 40°C und einer Konzentration von 0.1 M TCEP/0.4 M Morpholin wurden deutlich höhere Anteile (40%) der unerwünschten *N*-Formyl-Peptidspezies **89AN** erhalten, als bei Raumtemperatur (25%). Durch eine drastische Erhöhung der TCEP- und Morpholin-Konzentration ($c(\text{TCEP}) = 1.0 \text{ M}$; $c(\text{Morpholin}) = 4.0 \text{ M}$, pH 8.5) konnte die Bildung des Nebenproduktes **89AN** nahezu vollständig unterdrückt werden (<5%). Die Anwendung der optimierten Bedingungen (1.0 M TCEP, 4.0 M Morpholin, RT) ermöglichte nach 20 h einen vollständigen Umsatz des Startmaterials mit hoher Selektivität (>85%). Auf diesem Weg konnte das native Peptid **30AN** durch Anwendung einer HPLC-Reinigung in hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von 37% erhalten werden. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass die Auxiliar-Abspaltung bei hohen Temperaturen zunehmend über das *N*-Formyl-Intermediat **89XZ** verläuft, welches erst bei ausreichend hoher Morpholin-Konzentration, durch Aminolyse, in das native Peptid überführt wird. Wie im späteren Teil der Arbeit (Kapitel 4.2.8.) noch gezeigt wird, konnten diese Überlegungen durch NMR-Studien an ^{13}C -markierten Auxiliarpeptiden experimentell bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass mit dem 2MPE-Auxiliar erstmals ein Hilfsmolekül für die Auxiliar-vermittelte Peptidligation zur Verfügung stand, welches den Zugang zu einer Vielzahl von Verknüpfungsstellen ermöglicht und unter mild basischen Bedingungen mit hoher Selektivität entfernt werden kann.

4.2.4. Abspaltung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation

Wie bereits gezeigt werden konnte, bietet die sequentielle Reaktionsführung von Peptidligation und direkter Auxiliar-Abspaltung eine hervorragende Möglichkeit, um die gewünschten nativen Peptide mit geringerem Zeitaufwand und in höherer Gesamtausbeute zu erhalten (Abschnitt 4.1.4 und 4.1.8). Aufgrund dieser Vorteile sollte nach dieser Synthesestrategie nach dieser Synthesestrategie ebenfalls die Anwendung des 2MPE-Auxiliars erarbeitet werden.

Dazu wurde zuerst die Synthese des Gly-Gly-verknüpften Modellpeptids **86GG** untersucht. Die Peptidligation des Glycin-Peptidthioester **22G** mit dem Glycin-Auxiliarpeptid **84G** erfolgte rasch (90 min) und lieferte das gewünschte Ligationsprodukt **86GG** (Abbildung 30C'). Wie aus den vorherigen Untersuchungen bekannt war, verläuft die Abspaltung des 2MPE-besonders selektiv in wässrigen Lösungen von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) bei pH 8.5. Unter diesen Bedingungen konnte bei 40°C die Abspaltung des Auxiliars erreicht werden (Abbildung 30C''). Bemerkenswert ist, dass die Reaktion im Gegensatz zu den 6NP- und 5NP-Auxiliaren auch in Gegenwart von Thiophenol vollständig ablief. Auf diesem Weg konnte das Zielpeptid in hoher Reinheit und in einer sehr guten Ausbeute von 58% (über zwei Stufen) isoliert werden. Anschließend wurde die Reaktion des Alanin-Thioesters **22A** mit dem Glycin-Auxiliarpeptid **84G** untersucht. Die UPLC-Analyse zeigte, dass innerhalb von nur sechs Stunden ein nahezu quantitativer Umsatz erreicht wird (Abbildung 30D'). Um eine mögliche Bildung des N-Formyl-Nebenproduktes **89XZ** an der sterisch gehinderten Verknüpfungsstelle zu vermeiden (siehe Abschnitt 4.2.3), wurde die anschließende Abspaltung des Auxiliars bei niedriger Temperatur (rt) und mit hoher TCEP- und Morpholin-Konzentration ($c(\text{TCEP}) = 0.5 \text{ M}$; $c(\text{Morpholin}) = 2.0 \text{ M}$, pH 8.5) getestet. Unter diesen Bedingungen wurde das Ligationsprodukt **86AG** mit hoher Selektivität (86%) in das native Peptid **30AG** überführt. Nach Anwendung einer HPLC-Reinigung konnte das Ala-Gly-verknüpfte Modellpeptid **30AG** mit einer Gesamtausbeute von 48% (über zwei Stufen) isoliert werden. Anschließend wurde das etablierte Protokoll zum Aufbau der Leu-Gly- und der Gly-Asn-Verknüpfung in **30LG** und **30GN** getestet. Um die Peptidfragmente bei hoher Konzentration (5 mM) vollständig zu lösen, wurde dem Ligationspuffer Guanidinhydrochlorid (Abkürzung: GuHCl) zugesetzt. Nach der Verknüpfungsreaktion (14-20 h) konnte in beiden Fällen durch

Zugabe von 0.5 M TCEP und 2.0 M Morpholin das 2MPE-Auxiliar entfernt werden. Die nativen Peptide **30LG/30GN** wurden durch Anwendung einer HPLC-Reinigung in guter Ausbeute (44-49%, über zwei Stufen) und hoher Reinheit erhalten. Da glycinhaltige Ligationsstellen bereits durch ältere N^α -Auxiliare zugänglich waren, sollte im nächsten Schritt der Einsatz des 2MPE-Auxiliars an schwierigen Verknüpfungsstellen demonstriert werden. Dazu wurde zunächst die Reaktion des reaktiven Histidin-Peptidthioesters **22H** mit dem

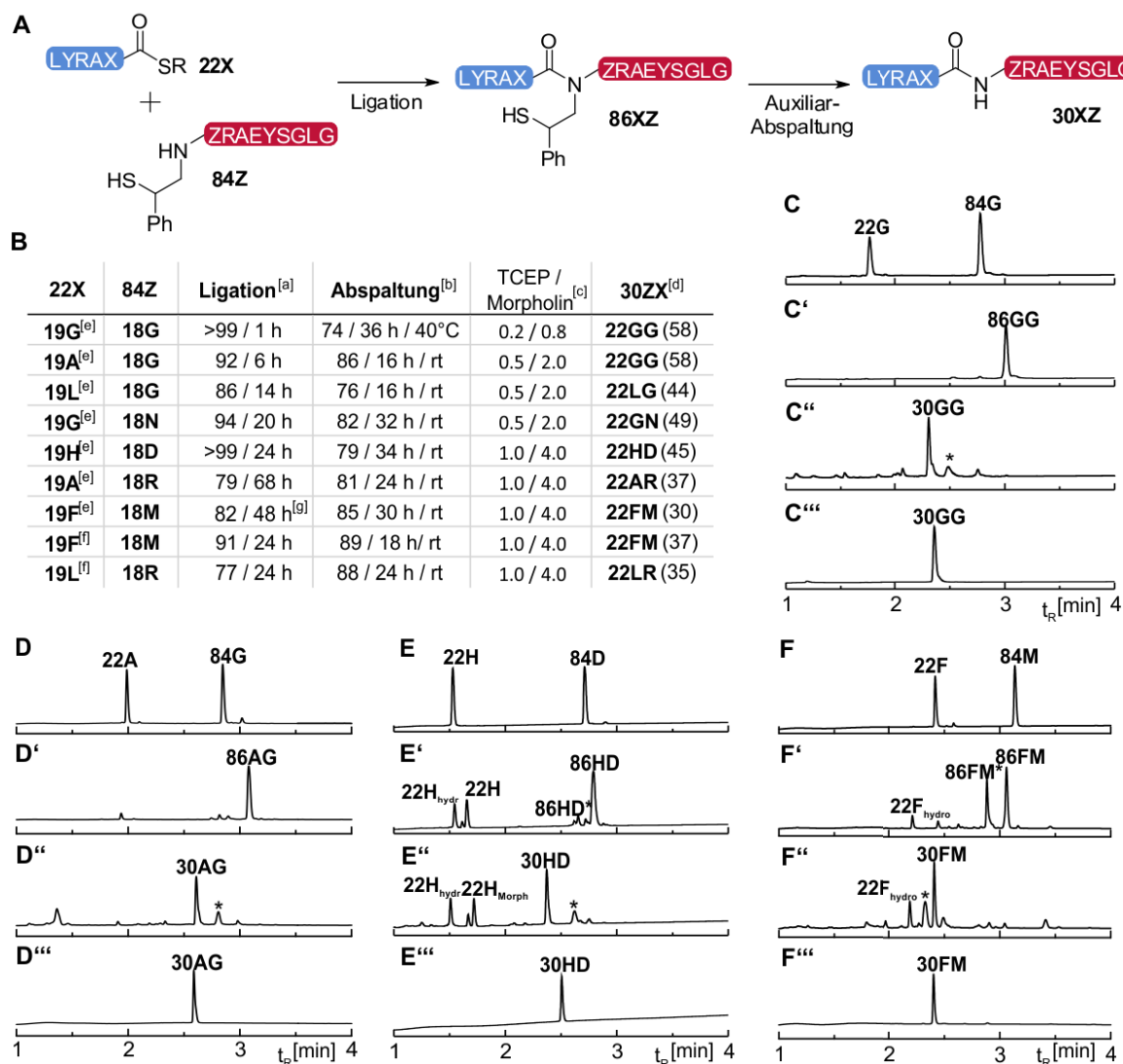


Abbildung 30: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (A). Tabellarische Zusammenfassung der durchgeführten Reaktionen, Reaktionszeiten, Reaktionsbedingungen und Ausbeuten (B). UPLC-MS-Analysen vor (C-F), nach der Peptidligation (C'-F'), nach der Auxiliar-Abspaltung (C''-F'') und der gereinigten Peptide (C'''-F'''). *: Nicht-peptidisches Material, das im Verlauf der Auxiliar-Abspaltung gebildet wird; **22H_{hydro}**/**22F_{hydro}**: Hydrolyseprodukt der Thioester **22H** und **22F**; **22H_{Morp}**: Aminolyse des Thioesters **22H**; **86HD***/**86FM***: S- und N-acetyliertes Produkt, welches durch Reaktion des Ligationsproduktes mit verbleibendem Peptidthioester gebildet wird. Bedingungen: Ligation: c(**84Z**) = (2-5 mM); 20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5; Auxiliar-Abspaltung in wässrigen Lösungen von TCEP (0.1-1.0 M) und Morpholin (1-4 M); c(Peptid) = 0.5mM; [a]: Analytische Ausbeute der Ligation in % (UPLC-MS Analyse)/Dauer der Ligation; [b]: Analytische Ausbeute der Auxiliar-Abspaltung in % (UPLC-MS Analyse)/Dauer der Reaktion/ Temperatur; [c] in M; [d] isolierte Ausbeute (nach HPLC-Reinigung) in %; [e]: R = (CH₂)₃CONHCH₂CONH₂; [f]: R = Ph; [g]: Ligation bei 37°C.

Asparaginsäure-Auxiliarpeptid **84D** untersucht. Nach 24 h wurde mit Hilfe der UPLC-Analyse ein hoher Umsatz (95%) der beiden Peptidfragmente nachgewiesen. Durch weitere Zugabe des Peptidthioesters **22H** konnte die Ausbeute der Peptidligation gesteigert werden (99%, 44 h). Anschließend wurde das 2MPE-Auxiliar bei Raumtemperatur, durch Zugabe einer wässrigen Lösung von 1 M TCEP und 4 M Morpholin, entfernt. Unter diesen Bedingungen konnten keine Spuren des *N*-Formyl-Nebenproduktes **89HD**, wie zuvor für das Ala-Asn-Ligationsprodukt beobachtet, nachgewiesen werden. Auch wenn die Abspaltung des Auxiliars an diesem Modellpeptid mehr Zeit benötigte (34 h), lieferte die zweistufige Reaktionsfolge das native Peptid **30HD** mit einer Gesamtausbeute von 45%. In weiteren Experimenten konnte der präparative Nutzen dieser Methode auch an anderen schwierigen Verknüpfungsstellen, wie Phe-Met und Ala-Arg, bestätigt werden (siehe Tabelle, Abbildung 30). Die Verknüpfungsreaktionen erforderten allerdings lange Reaktionszeiten (48-68 h), obwohl die Phe-Met-Ligation bereits bei 37°C durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Reaktionsführung bei erhöhter Temperatur von Racemisierung begleitet wurde. Um diese Probleme zu umgehen wurde der Einsatz von reaktiven Arylpeptidthioestern **22X** (X = F, L; R = Ph) getestet, welche selbst bei Raumtemperatur hohe Reaktionsumsätze ermöglichen sollten. Zusätzlich wurden die Thioester im Überschuss (1.8 – 2.0 Äq.) verwendet. Unter diesen Bedingungen lieferte die Phe-Met-Ligation bereits nach 24 h einen Umsatz von über 90%. Nach Abspaltung des Auxiliars und der Reinigung des Rohproduktes, wurde das Phe-Met-verknüpfte Peptid **30FM** mit einer Ausbeute von 37% erhalten. Nach dieser Strategie konnte selbst der Aufbau der sterisch anspruchsvollen Leu-Arg-Amidbindung in **30LR** erreicht werden (35% Ausbeute über 2 Stufen).

Mit Hilfe dieser Studie konnte wiederholt der hohe präparative Nutzen der direkten Auxiliar-Abspaltung, welche ohne intermediäre Reinigung im Anschluss an die Peptidligation erfolgt, demonstriert werden. Zusätzlich wurde durch Einsatz des 2MPE-Auxiliars die Anwendbarkeit der Methode auf schwierige Verknüpfungsstellen erweitert. Im Vergleich zu bisher verfügbaren *N*^α-Auxiliaren konnte damit eine erhebliche Verbesserung (keine Glycin-Limitierung, Auxiliar-Abspaltung unter mild-basischen Bedingungen, direkte Abspaltung des Auxiliars im Anschluss an die Peptidligation) dieser ENCL-Methode erreicht werden.

4.2.5. Anwendung des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars in der chemischen Synthese antimikrobieller Peptide

Nachdem das 2MPE-Auxiliar erfolgreich an Modellpeptiden getestet wurde, sollte im nächsten Schritt das volle Potential des 2MPE-Auxiliars an größeren Peptidstrukturen unter Beweis gestellt werden. Dazu sollte dessen Einsatz für die Synthese der antimikrobiellen Peptide Dermcidin-1L (DCD-1L) und Opisthonorin-2 (OP2) erfolgen. Dermcidin wird in den menschlichen Schweißdrüsen produziert und dient als Vorstufe kürzerer antimikrobieller Peptide, welche auf der Hautoberfläche als erste Verteidigungslinie des Immunsystems dienen.^[93] Dieses 48 Aminosäuren lange Peptid besitzt keinen Cystein-Rest und ist damit ein geeignetes Zielpeptid für den Einsatz der Auxiliar-vermittelten Peptidligation. Mit dem Ziel eine besonders rasche Verknüpfung der Peptidfragmente zu ermöglichen, sollte die Gly¹⁶-Gly¹⁷-Amidbindung zum Aufbau des Volllängenpeptids genutzt werden. Die Fmoc-basierte Festphasensynthese des N-terminalen DCD-1L Fragments **90** (1-16) erfolgte an einem Chlorotriyl-Harz. Anschließend wurde das Peptidfragment unter leicht sauren Bedingungen vom polymeren Träger entfernt und dabei die vollständig geschützte Peptidsäure **91** erhalten. Diese konnte bei Raumtemperatur durch nachfolgende Reaktion mit Thiophenol in Gegenwart von PyBOP als Aktivator quantitativ in den entsprechenden Peptidthioester überführt werden.^[94] Nach Abspaltung der Schutzgruppen und Anwendung einer HPLC-Reinigung konnte auf diesem Weg der gewünschte Peptidthioester **92** in hoher Reinheit erhalten werden (26% Ausbeute).

Das C-terminale Fragment **93** (17-48) wurde nach der Fmoc-Strategie an einem Rinkamid-Harz aufgebaut. Erste Versuche ermöglichten jedoch nur geringe Gesamtausbeuten der Festphasenpeptidsynthese (~40% entsprechend der photometrischen Konzentrationsbestimmung des Fulven-Adduktes im Anschluss an die Festphasenpeptidsynthese; siehe Kapitel 6.4.). Durch den Einsatz von Pseudoprolindipeptiden an den Positionen 31 und 46 konnte die Effizienz der Synthese deutlich gesteigert werden (~70% Ausbeute). Die Einführung des 2MPE-Auxiliars durch reduktive Aminierung des S-Dmt-geschützten Aldehyds **83** mit dem Harz-gebundenen Volllängenpeptid lieferte das gewünschte Auxiliarpeptid **95**, welches nach TFA-Abspaltung und HPLC-Reinigung mit einer Gesamtausbeute von 13% erhalten wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Verknüpfung der beiden Peptidfragmente **92** und **95**. Aufgrund

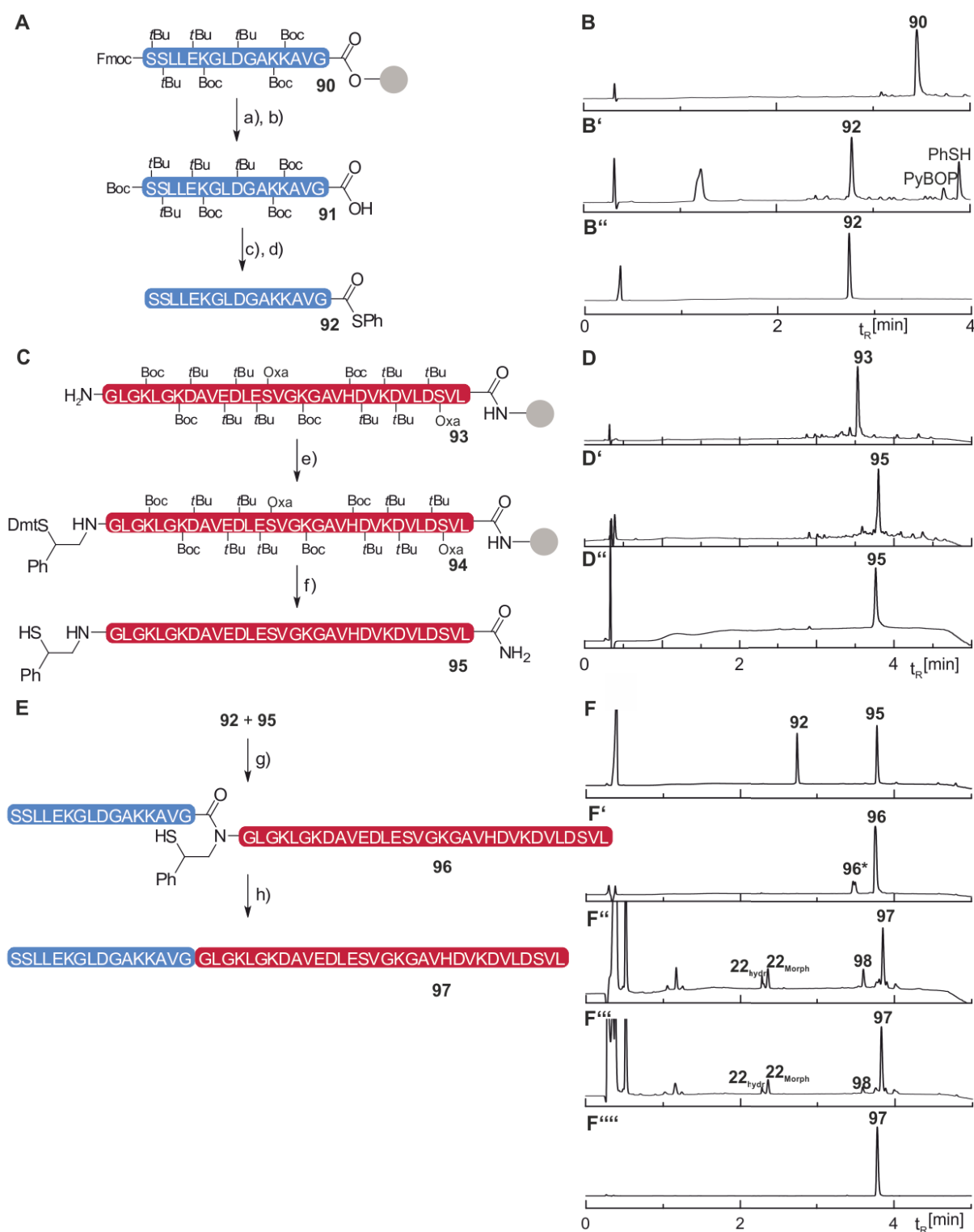


Abbildung 31: Synthese des N-terminalen DCD-1L Peptidfragments 92 (A): UPLC-Analyse der nach der TFA-Behandlung erhaltenen Rohprodukte vor (B), nach (B') der Bildung des Peptidthioesters und des gereinigten Peptidthioesters 92 (B''). Synthese des C-terminalen DCD-1L Peptidfragments 95 (C): UPLC-Analyse der nach der TFA-Behandlung erhaltenen Rohprodukte vor (D), nach (D') der reduktiven Aminierung und des gereinigten Auxiliar-Peptids 93 (D''). Synthese von DCD-1L (97) (E): UPLC-Analyse vor (F) und nach (F') der Ligation, nach der Auxiliar-Abspaltung (F''/F''') und des gereinigten DCD-1L Peptids (97). 92_{hyd}/92_{Morph}: Hydrolyse- und Aminolyse-Produkte von 92; 96*: S- und N-acetyliertes Produkt; 98: N-Methyl-Nebenprodukt. Bedingungen: a) Piperidin, DMF, RT, dann Boc₂O, DIPEA, DMF, RT; b) AcOH, CF₃CH₂OH, CHCl₃, RT; c) PhSH, DIPEA, PyBOP, RT, d) TFA/TIS, RT; e) 83, NaCNBH₃, AcOH, NMP, iPrOH, RT; f) TFA/TIS, RT; g) c(Peptid) = 1.66 mM, 20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7.5; h) c(Peptid) = 0.5 mM, 0.15 M TCEP, 0.6 M Morpholin, 40°C (F'') oder c(Peptid) = 0.25 mM, 0.3 M TCEP, 1.2 M Morpholin, 40°C (F'''). Oxa: Pseudoprolin-Dipeptid.

der hohen Reaktivität des Arylpeptidthioesters konnte die Peptidligation ohne Zusatz eines Thioladditives durchgeführt werden und erreichte nach nur 90 Minuten einen vollständigen Umsatz. Neben dem Ligationsprodukt **96** wurden geringe Mengen des *N*- und *S*-acetylierten Produktes **96*** beobachtet, das vermutlich durch weitere Reaktion mit restlichen Peptidthioester **92** gebildet wurde. Um die gewünschte Auxiliar-Abspaltung zu erreichen, wurde zuerst der Einsatz einer wässrigen Lösung von 0.15 M TCEP und 0.6 M Morpholin bei 40°C getestet (Peptidkonzentration = 0.5 mM). Nach zehn Stunden konnte unter diesen Bedingungen das gewünschte Dermcidin-Peptid **97** als Hauptprodukt nachgewiesen werden (Abbildung 31F''). Allerdings wurde die Ausbeute der Reaktion durch die Bildung des *N*-Methyl-Nebenproduktes **98** leicht vermindert. Wie im Kapitel 4.2.3 gezeigt wurde, ist es möglich die Selektivität der Auxiliar-Abspaltung an einer Gly-Gly-Schnittstelle durch eine weitere Erhöhung der TCEP- und Morpholin-Konzentration zu steigern, sofern die TCEP-Konzentration unter 0.4 M verbleibt. Um einen möglichst hohen Überschuss an TCEP und Morpholin zu ermöglichen, wurde deren Konzentration ($c(\text{TCEP}) = 0.3 \text{ M}$; $c(\text{Morpholin}) = 1.2 \text{ M}$) verdoppelt und zusätzlich die zweifache Menge an Abspaltlösung verwendet (Peptidkonzentration = 0.25 mM). Unter diesen Bedingungen wurde die Bildung der *N*-Methyl-Peptidspezies **98** deutlich reduziert (Abbildung 31F'''). Durch Anwendung einer HPLC-Reinigung wurde das gewünschte DCD-1L-Peptid **97** in hoher Ausbeute (66%, über zwei Stufen) und Reinheit isoliert.

Für die chemische Synthese von Opistoporin-2 sollte die Leistungsfähigkeit des 2MPE-Auxiliars an einer anspruchsvollen Ligationsstelle unter Beweis gestellt werden. Opistoporin-2 (OP2) wurde in afrikanischen Skorpionen der Gattung *Opisthophthalmus carinatus* entdeckt und gehört zu der Klasse der antimikrobiellen, α -helicalen und Poren-bildenden Peptide.^[95] Das 44 Aminosäuren lange Peptid besitzt keinen Cystein-Rest, wodurch die Synthese durch Anwendung der NCL nicht möglich ist. Auch der Einsatz bisher verfügbarer N^α -Auxiliare scheidet aus, da die zwei Glycin-Reste in der Sequenz des Zielpeptids für Auxiliar-vermittelte Peptidligationen ungeeignet positioniert sind (Anmerkung: Der ¹Gly-Rest befindet sich direkt am N-Terminus und der ⁴⁰Gly-Rest ist nur vier Aminosäuren vom C-Terminus entfernt). Aus diesen Gründen stellte Opistoporin-2 ein geeignetes Zielpeptid zur Anwendung des 2MPE-Auxiliars dar. Für die Synthese von Opistoporin-2 wurde die Ser¹⁷-Glu¹⁸-Position als geeignete Ligationsstelle gewählt, da der Einsatz des 2MPE-Auxiliars an dieser Verknüpfungsstelle

bereits erfolgreich getestet wurde (siehe Kapitel 4.2.2/4.2.3). Im Fall des C-terminalen Fragments **99** wurde ein Pseudoprolin-Dipeptid (Asn²⁵-Thr²⁶) verwendet, um die Effizienz der SPPS zu erhöhen. Die Einführung des Auxiliars erfolgte durch reduktive Aminierung und lieferte das gewünschte Auxiliar-Peptid **100** (Abbildung 32A). Dieses konnte durch anschließende HPLC-Reinigung in hoher Reinheit und mit einer Ausbeute von 23% isoliert werden. Während der Lagerung des C-terminalen Peptidfragments **100** in 0.1% TFA wurde die Bildung des N-terminalen Thiolactons **101** beobachtet (Abbildung 32B''). Durch Lagerung des Peptids als gefriergetrockneten Festoff, konnte die ungewünschte Thiolactonisierung auf einfache Weise verhindert werden. Das N-terminale Fragment wurde auf einem Chlorotriptyl-Harz aufgebaut, als vollständig geschützte Peptidsäure abgespalten und durch Reaktion von 3-Mercaptopropionsäuremethylester in Gegenwart von PyBOP bei -25°C in den Alkylthioester überführt. Die anschließende TFA-Behandlung und anschließender präparative HPLC-Reinigung lieferte den Peptidthioester **102** (Abbildung 32: R = (CH₂)₂CO₂CH₃). In ersten Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass unter NCL-Bedingungen eine rasche Racemisierung des Thioesters erfolgte. Nach 24 h wurde bei pH 7.5 und 37°C im Ligationspuffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄) bereits 31% des epimerisierten Nebenproduktes **102_{rac}** nachgewiesen (Abbildung 32D). Bei Raumtemperatur konnte die Nebenreaktion bereits reduziert (31%→8%) werden. Zusätzlich zeigte sich, dass mit abnehmenden pH-Wert (8.0→7.0) der Anteil der racemisierten Peptidspezies weiter verringert wurde (siehe Abbildung 32D'-D'''). Erst durch die Verwendung eines auf pH 6.5 eingestellten Ligationspuffers, konnte die Racemisierung bei Raumtemperatur vollständig unterdrückt werden. Unter diesen Bedingungen ermöglichte die Reaktion des Peptidthioesters **102** mit dem C-terminalen Auxiliarpeptidfragment **100** allerdings nur eine geringe Ausbeute (19%, nach 24 h) des Ligationsproduktes **103** (Abbildung 32F'). Um die Effizienz der Peptidligation zu steigern, wurde die Reaktion bei pH 7.0 durchgeführt. Dies erhöhte die Ausbeute der Verknüpfungsreaktion jedoch nur geringfügig (19%→26%, Abbildung 32F''). Um eine Racemisierung des Thioesters zu vermeiden, wurde eine weitere Optimierung der Verknüpfungsreaktion durch eine Erhöhung des pH-Wertes nicht weiter untersucht. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur (rt→37°C) ermöglichte zwar eine deutlich gesteigerte Ausbeute des Ligationsproduktes **103** (19%→42%), allerdings bildete sich unter diesen Bedingungen geringe Mengen der racemisierten Nebenprodukte **102_{rac}** und **103_{rac}** (Abbildung

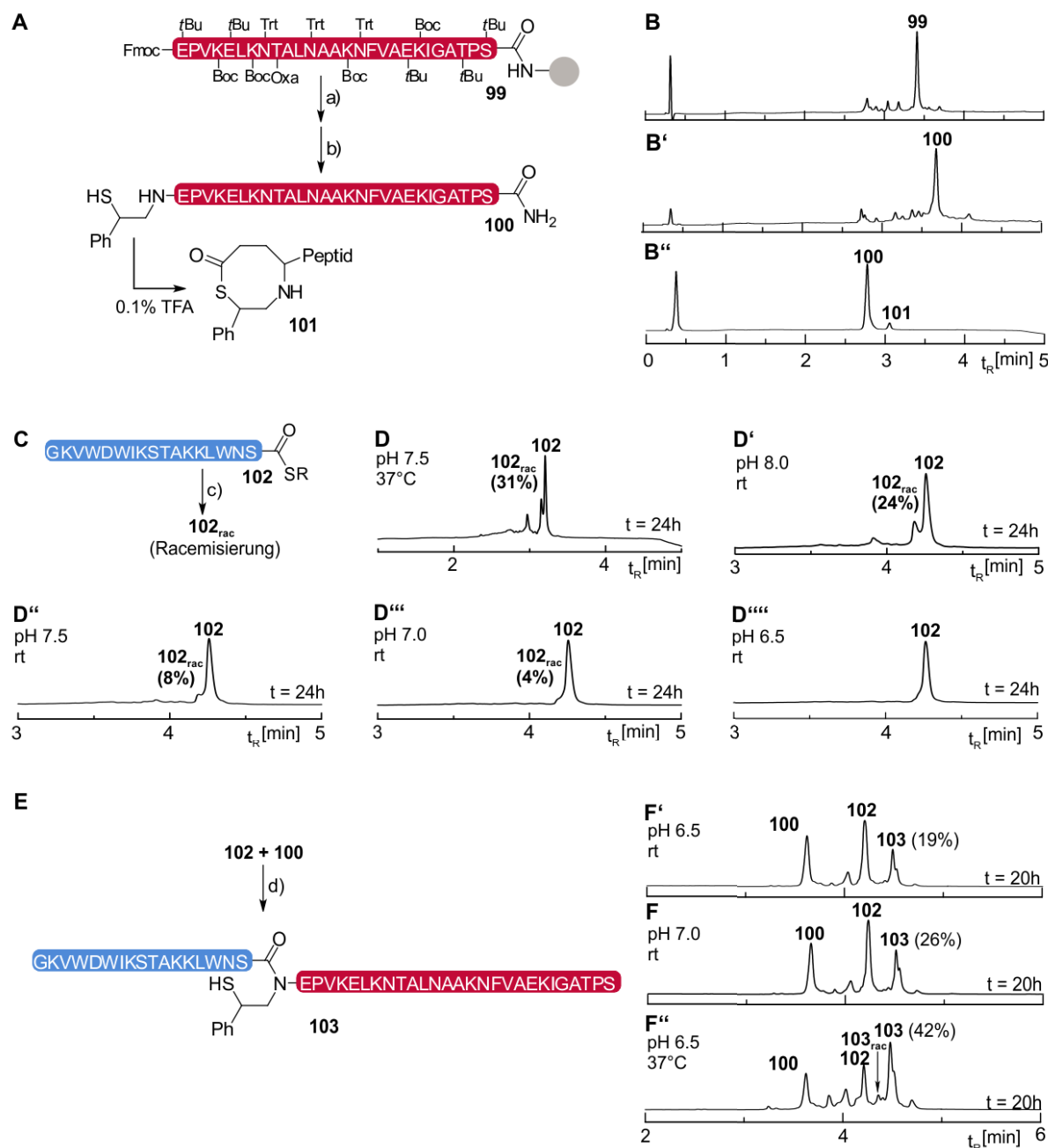


Abbildung 32: Synthese des C-terminalen Peptidfragments **100** und Bildung des Thiolactons **101** unter sauren Bedingungen (A); UPLC-Analyse der erhaltenen Rodprodukte vor (B) und nach (B') der reduktiven Aminierung (jeweils nach TFA-Behandlung) sowie des gereinigten Auxiliar-Peptids **103** (B''). Racemisierung des Peptidthioesters **102** bei unterschiedlicher Temperatur und pH-Wert (C; UPLC-Analysen nach 24 h in D-D'''). Verknüpfung der beiden Peptidfragmente **100** und **102** bei unterschiedlichen Bedingungen (E; UPLC-Analysen nach 20 h in F-F''). Bedingungen: a) **83**, NaCNBH₃, AcOH, NMP, iPrOH, RT; b) TFA/TIS, RT; c) c(Thioester) = 1 mM, 6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH und Temperatur wie in D-D'''' angegeben; d) c(Peptid) = 2.0 mM, 6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH und Temperatur wie in F-F'' angegeben. UPLC-Analysen B/B' nach TFA-Behandlung. Oxa: Pseudoprolin-Dipeptid. R = (CH₂)₂CO₂CH₃.

32F''). Anhand dieser Ergebnisse wurde ersichtlich, dass der C-terminale Alkylpeptidthioester **102** nur unter sehr milden Ligationsbedingungen für ENCL-Reaktionen eingesetzt werden konnte und dabei nur geringe Ausbeuten der Verknüpfungsreaktion ermöglichte.

Um die Effizienz der Peptidligation zu steigern, wurde im nächsten Schritt der Einsatz von Arylpeptidthioestern untersucht. Diese müssten aufgrund ihrer hohen Reaktivität auch unter milden Bedingungen ($\text{pH} = 6.5$, RT) hohe Ausbeuten ermöglichen. Für die Synthese des benötigten Arylthioesters **106** wurde die vollständig geschützte Peptidsäure **105** mit Thiophenol in Gegenwart von PyBOP als Aktivator bei -25°C umgesetzt (Abbildung 33A). Die UPLC-MS-Analyse bestätigte, dass die Reaktion in vier Stunden quantitativ verlief (Abbildung 33B'). Geringe Mengen des racemisierten Thioesters ($<3\%$) wurden im Zuge der

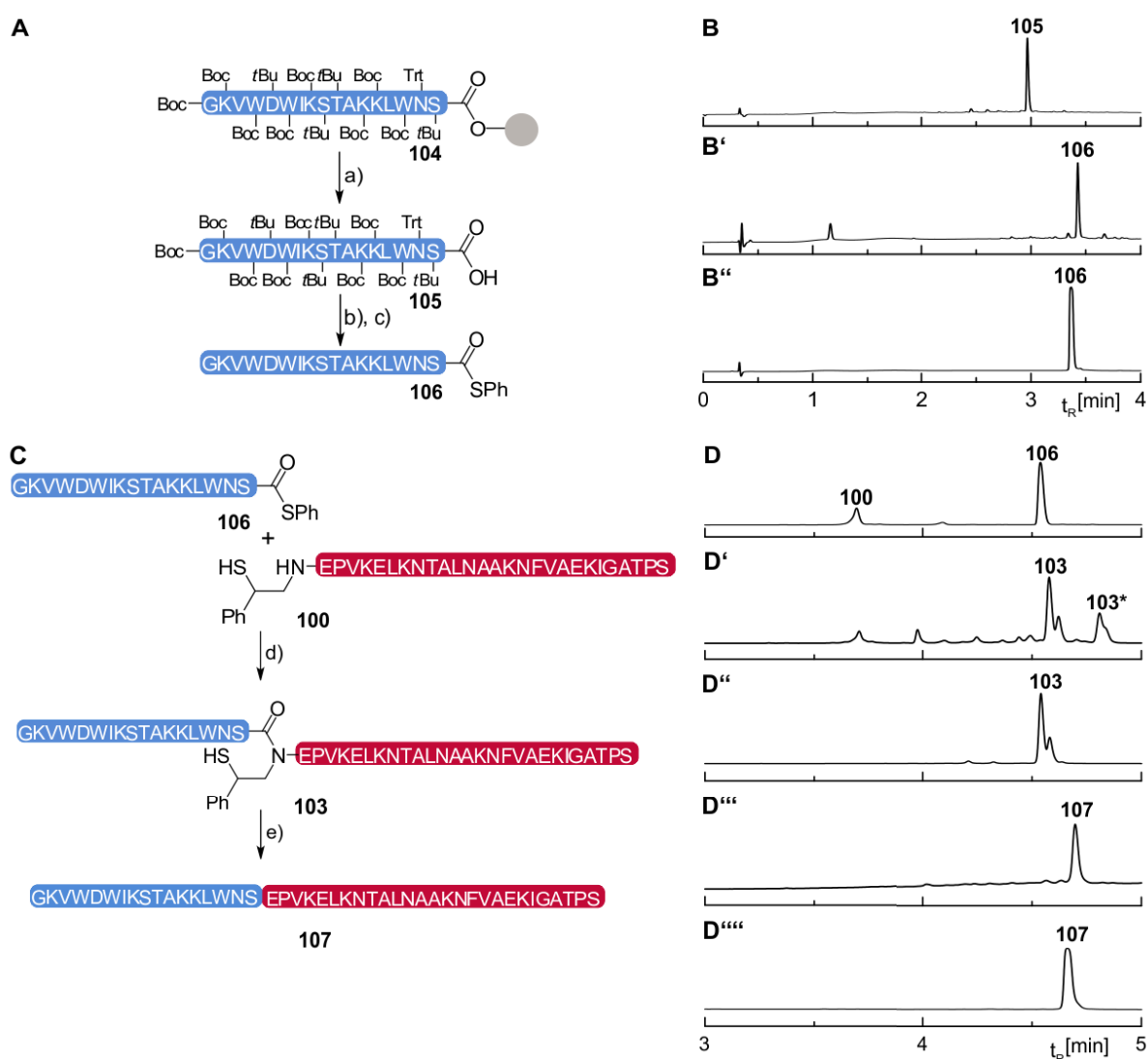


Abbildung 33: Synthese des Arylpeptidthioesters **106** (A): UPLC-Analyse vor (B) und nach (B') der Bildung des Thioesters sowie des gereinigten Peptidthioesters **92** (B''). Synthese (C) von Opistoporin-2 (**107**) durch Auxiliar-vermittelte Peptidligation: UPLC-Analyse vor (D) und nach (D') der Ligation, des gereinigten Ligationsproduktes **103** (D''), nach der Auxiliar-Abspaltung (D''') und des gereinigten nativen Peptids **107** (D'''). **103***: S- und N-acetyliertes Produkt. Bedingungen: a) AcOH , $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CHCl_3 , RT; b) PhSH , DIPEA , PyBOP , RT, c) TFA/TIS , RT; d) $c(\text{Thioester}) = 4 \text{ mM}$, 20 mM TCEP , $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH } 6.8$, RT, 10 h ; h) $c(\text{Peptid}) = 0.125 \text{ mM}$, 0.3 M TCEP , 1.2 M Morpholin , $\text{pH } 8.5$, 40°C , 3 h . UPLC-Analysen B/B' nach TFA-Behandlung.

HPLC-Reinigung entfernt und der gewünschte Arylpeptidthioester **106** mit 38% Ausbeute und in hoher Reinheit isoliert. Im nächsten Schritt wurde der Arylpeptidthioester **106** mit dem C-terminalen Auxiliärpeptidfragment **100** in Ligationspuffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄) bei pH 6.8 und Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Dabei zeigte sich, dass das reaktive Thioesterfragment **106** bereits nach zehn Stunden vollständig, unter Bildung des Ligationsproduktes **107**, umgesetzt wurde (Abbildung 33 D''). Die Peptidligation lieferte signifikante Mengen (24%) des S- und N-acetylierten Ligationsproduktes **107***, welches jedoch durch Zugabe von 2M NaOH in das gewünschte Verknüpfungsprodukt **107** überführt (Hydrolyse des Thioesters in **107***) werden konnte. Auf diesem Weg wurde das HPLC-gereinigte Ligationsprodukt **107** mit 41% Ausbeute erhalten. Im letzten Schritt der Opistoporin-Synthese erfolgte die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars, welche durch Behandlung des Ligationsproduktes mit einer wässrigen Lösung von 0.3 M TCEP und 1.2 M Morpholin bei 40°C in nur drei Stunden gelang (Abbildung 33D'''). Durch Anwendung eines HPLC-basierten Reinigungsschrittes konnte schließlich das gewünschte native OP-2 Peptid **107** in guter Ausbeute (57%) und exzellenter Reinheit isoliert werden. Wie anhand der UPLC-Analyse in Abbildung 33D'/D'' ersichtlich, wurde das Ligationsprodukt **107** stets als Doppelpeak beobachtet. Dabei handelt es sich vermutlich um die chromatographische Auftrennung der beiden Diastereoisomere, welche aus der Verwendung des racemischen Aldehyds **83** (β -ständiges chirales C-Atom des Auxiliars) resultieren. Die im 2-Mercapto-phenethyl-Gerüst gespeicherte Stereoinformation geht jedoch im Verlauf der Auxiliär-Abspaltung verloren, weshalb das native Diastereoisomer des OP-2 Peptid **107** nur in Form eines einfachen Peaks im UPLC-Chromatogramm beobachtet wird (Abbildung 33D''').

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Synthese von Opistoporin-2 auch ohne intermediäre Reinigung des Ligationproduktes erfolgen konnte (Abbildung 34). Dazu wurden die beiden Peptidfragmente **100** und **106** im Ligationspuffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 6.8) verknüpft und anschließend das Reaktionsgemisch mit einer wässrigen Lösung von 0.3 M TCEP und 1.2 M Morpholin versetzt. Im Vergleich zu der Abspaltung des 2MPE-Auxiliars vom gereinigten Ligationsprodukt **107** verlief die Reaktion im direkten Anschluss an die Peptidligation deutlich langsamer (12 h). Zusätzlich konnte im Rohprodukt der zweistufigen Reaktionsfolge erhebliche Mengen eines Nebenproduktes **108** nachgewiesen werden, welches auf eine unvollständige Abspaltung des Auxiliars (verbleibende

Methylgruppe, Diskussion Kapitel 4.2.8.) am nativen OP-2 **107** hindeutet. Dennoch konnte durch Anwendung dieses Protokolls das gewünschte Peptid **107** in hoher Reinheit und mit einer isolierten Ausbeute von 21% (zwei Stufen) erhalten werden. Im Vergleich zu der Syntheseroute bei der eine zusätzliche HPLC-Reinigung des Ligationsproduktes erfolgte (Gesamtausbeute 23%), ermöglichte die zweistufige Reaktionsführung folglich eine vergleichbare Gesamtausbeute (21%) mit geringerem Zeitaufwand. Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel die Leistungsfähigkeit des 2MPE-Auxiliars anhand der chemischen Totalsynthese des DCD-1L und OP-2 Peptids demonstriert werden.

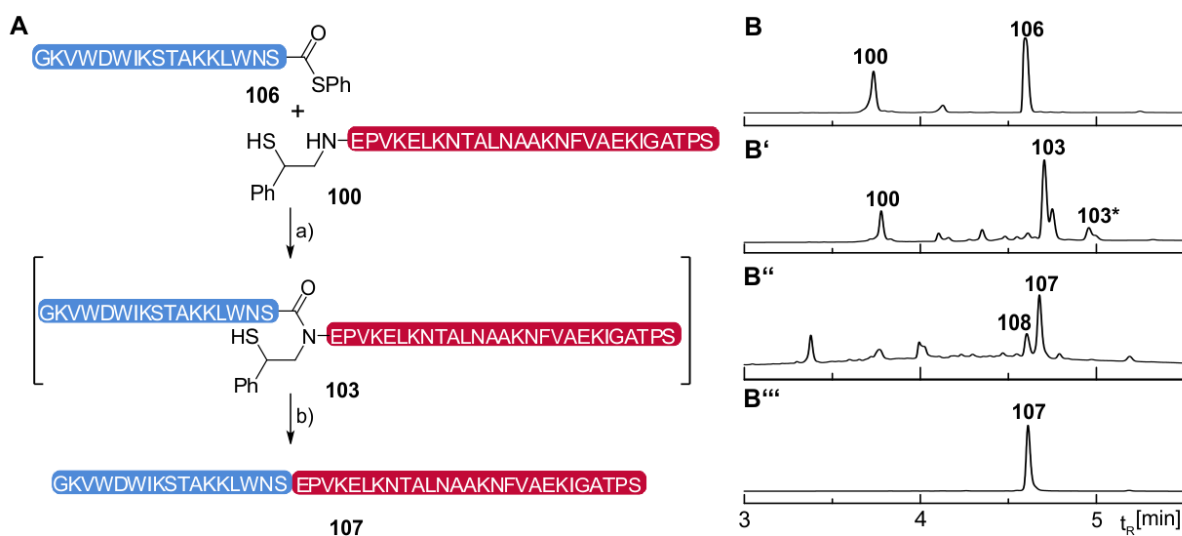


Abbildung 34: Synthese von Opistoporin-2 (**107**) durch Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (A): UPLC-Analyse vor (B) und nach (B') der Ligation, nach der Auxiliars-Abspaltung (B'') und des gereinigten nativen Peptids **107** (B'''). **103***: S- und N-acetyliertes Produkt; **108**: Nebenprodukt (Methylierung von **107**). Bedingungen: a) $c(\text{Thioester}) = 4 \text{ mM}$, 20 mM TCEP , $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,8, RT; b) $c(\text{Peptid}) = 0.27 \text{ mM}$, 0.3 M TCEP , 1.2 M Morpholin , pH 8,5, 40°C .

4.2.6. Grenzen des 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Durch Einführung des 2MPE-Grundgerüsts wurde die Reichweite der Auxiliars-vermittelten Peptidligation deutlich erweitert und damit ein bedeutender Fortschritt für die Entwicklung eines „universellen Werkzeuges“ für die ENCL erreicht. Im Verlauf der Arbeit musste jedoch festgestellt werden, dass die Anwendung des 2MPE-Auxiliars in besonders anspruchsvollen Verknüpfungsreaktionen nicht zum Erfolg führt. Diese Einschränkung konnte besonders deutlich am Beispiel der Val-Asn-Peptidligation beobachtet werden (Abbildung 35). Nach sechs Stunden lieferte die Reaktion zwischen dem Valinpeptidthioester **22V** und dem

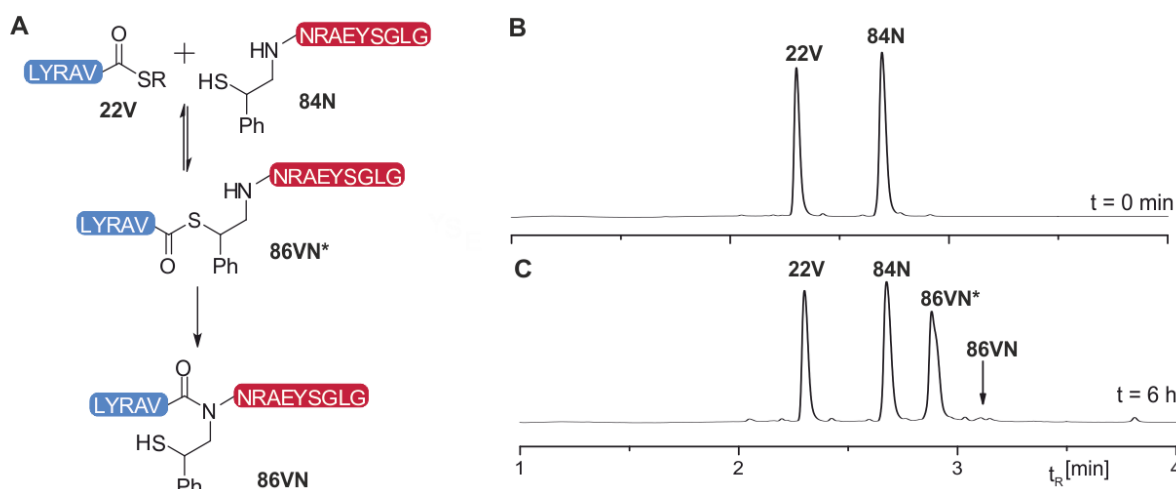


Abbildung 35: 2MPE-Auxiliar-vermittelte ENCL-Reaktion an einer Val-Asn-Verknüpfungsstelle (A): UPLC-Analyse vor (B) und nach 6h (C) der Ligation. ENCL-Bedingungen: $c(\text{Peptide}) = 2 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 20 mM TCEP , $\text{pH } 7.5$, 3 Vol.-% PhSH , RT .

Asparaginauxiliarpeptid **84N** zwar erhebliche Mengen des Thioester-verknüpften Intermediates **86VN***, aber nur Spuren ($<1\%$) des gewünschten Amid-verknüpften Ligationsproduktes **86VN** (Abbildung 35C). Demzufolge ermöglicht das 2MPE-Auxiliar effiziente Thiolaustauschreaktionen, selbst mit sterisch anspruchsvollen Peptidthioestern. Jedoch scheitert die Verknüpfungsreaktion am nachfolgenden $\text{S} \rightarrow \text{N}$ -Acytransfer. Dieser Umstand ist wahrscheinlich auf folgende Ursachen zurückzuführen: 1.) die sterisch anspruchsvolle Isopropylgruppe des C-terminalen Valin-Restes erschwert den nukleophilen Angriff des sekundären Amins; 2.) der sterische Anspruch des sekundären Amins wird durch die Seitenkette des Asparagin-Restes (α -verzweigte Aminosäure) erhöht. Die besonders geringe Geschwindigkeit der Verknüpfungsreaktion (1% Ausbeute nach 6h) resultiert vermutlich aus der Kombination dieser zwei nachteiligen Strukturmerkmale und macht eine Anwendung des 2MPE-Auxiliars an dieser Ligationsstelle unpraktikabel. Folglich sollte die Anwendung des 2MPE-Auxiliars vermieden werden, wenn an der Verknüpfungsstelle eine β -verzweigte Aminosäure (β -verzweigte Aminosäuren: Isoleucin, Threonin und Valin; α -verzweigte Aminosäuren: alle Aminosäuren außer Glycin) beteiligt ist. Abschließend muss angemerkt werden, dass Peptidligationen am 2MPE-Auxiliar deutlich langsamer verlaufen als sequenzanalogue Verknüpfungsreaktionen, welche durch Thiol-modifizierte Aminosäuren (NCL, Ligations-Entschwefelungsstrategie) vermittelt werden.

Als Beispiel eignet sich die Ala-Asn-Ligation: An dieser Verknüpfungsstelle ermöglichte das 2MPE-Auxiliar nach 24 h eine Ausbeute von 58% (Abschnitt 4.2.2). Im Gegensatz dazu konnte

in Arbeiten von *Payne et al.* eine vergleichbare Ausbeute in weniger als 5 Minuten durch die Verwendung eines N-terminalen β -Thio-Asparaginrestes erreicht werden.^[36n] Auch wenn eine Gegenüberstellung aufgrund der unterschiedlichen Ligationsbedingungen schwierig ist, lässt sich anhand dieser Ergebnisse jedoch eine verringerte Reaktivität des 2MPE-Auxiliars ableiten. In beiden Fällen wird die Ligation über ein sekundäres Thiol und einen 5-gliedrigen Übergangszustand vermittelt. Allerdings erfolgt der S \rightarrow N-Acyltransfer am N-terminalen β -Thio-Asparaginrest über ein primäres Amin. Im Gegensatz dazu ist an der (2MPE)-Auxiliar-vermittelten Peptidligation ein sekundäres Amin beteiligt, welches vermutlich aufgrund des erhöhten sterischen Anspruches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (S \rightarrow N-Acyltransfer) der Verknüpfungsreaktion beeinträchtigt. Demnach scheint die Geschwindigkeit und Reichweite der Auxiliar-vermittelten Peptidligation hauptsächlich durch das stets vorhandene sekundäre Amin limitiert zu werden.

4.2.7. Auxiliar-Abspaltung in Gegenwart von Cystein-Resten

Die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars wird durch eine radikalische Entschwefelung initiiert. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass Cystein-Reste im Verlauf der Auxiliar-Abspaltungsreaktion temporär maskiert werden müssen, damit diese vor unerwünschten Entschwefelungsreaktionen (Cys \rightarrow Ala) geschützt werden. Um diese Überlegungen zu überprüfen, sollte zunächst die Entfernung des 2MPE-Auxiliars an dem Modellpeptid **110**, welches einen ungeschützten Cystein-Rest besitzt, untersucht werden (Abbildung 36). Dazu wurde der Glycinpeptidthioester **22G** mit dem cysteinhaltigen Auxiliarpeptid **109** im Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, pH = 7.5, 3 Vol.-% PhSH) zur Reaktion gebracht und dabei das Gly-Gly-verknüpfte Ligationsprodukt **110** erhalten. Durch anschließende Zugabe einer wässrigen Lösung von 0.2 M TCEP und 0.8 M Morpholin erfolgte bei 40°C die Entfernung des Auxiliars. Wie vermutet, lieferte die Reaktion das alaninhaltige Peptid **111** als Hauptprodukt, welches aus einer Entschwefelung des Cystein-Restes im Zuge der Auxiliar-Abspaltung resultiert (siehe Abbildung 36D). Das cysteinhaltige Zielpeptid **113** konnte unter diesen Bedingungen nur in Spuren nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Bildung der Peptidspezies **112** beobachtet, welche auf eine Abspaltung des C-terminalen Cystein-Restes hindeutet. Diese Nebenreaktion wurde bereits von *Russel et al.* unter ähnlichen Bedingungen (wässrige TCEP-Lösung, pH 8, RT) beschrieben. Die Autoren vermuteten, dass

die Entfernung des Cystein-Restes über eine β -Fragmentierung erfolgt, welche durch Reaktion mit TCEP eingeleitet wird.^[96] Demnach könnte die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars und des Cysteinrestes nach einem ähnlichen Mechanismus erfolgen. Die Ergebnisse bestätigten, dass der Einsatz des 2MPE-Auxiliars für die Synthese von cysteinhaltigen Peptiden eine temporäre Maskierung der Cystein-Thiolfunktion voraussetzt. In diesem Zusammenhang wurde die Verwendung der Phenylacetamidomethyl-Schutzgruppe (Phacm) getestet, welche in

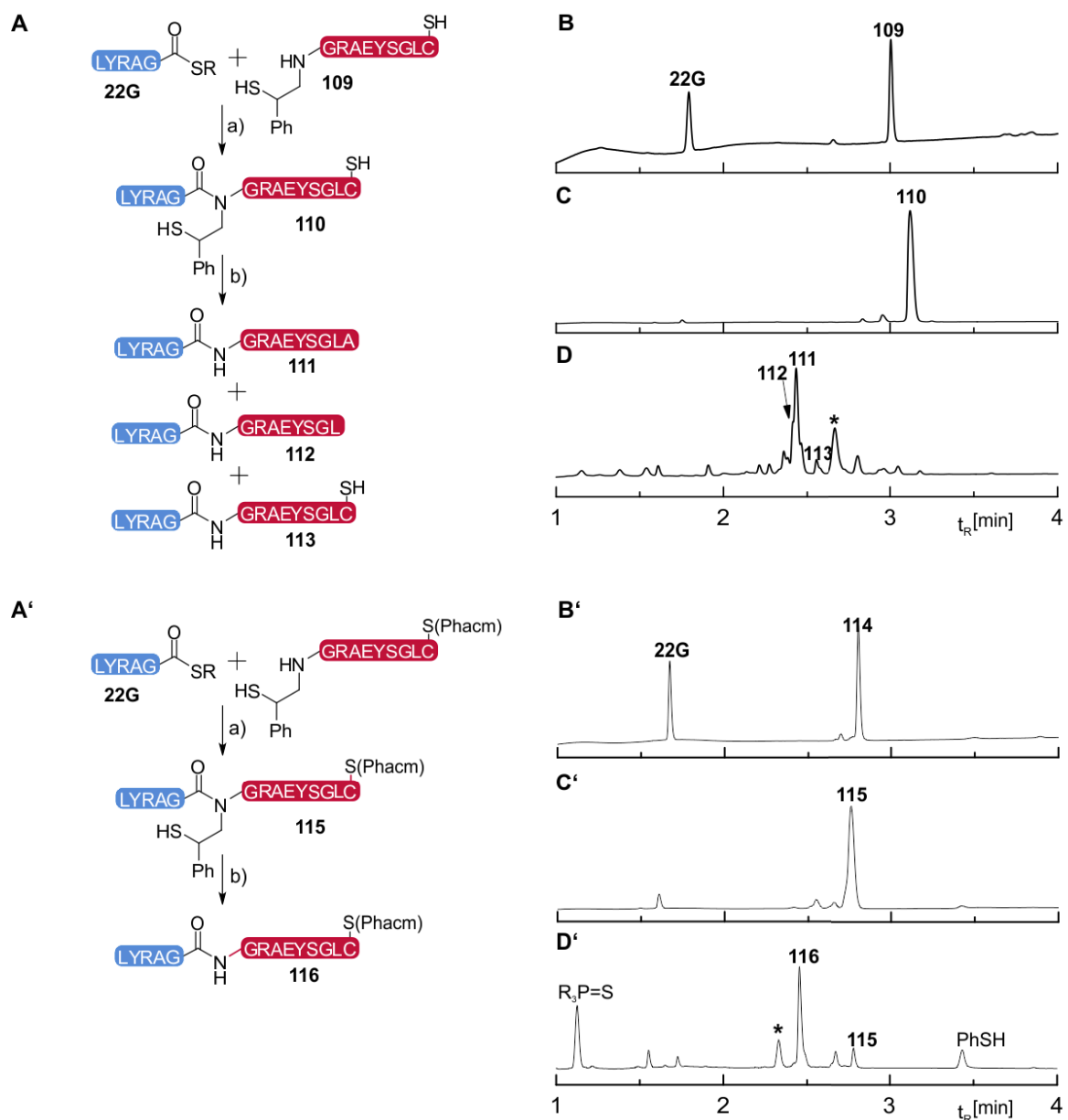


Abbildung 36: Einsatz des 2MPE-Auxiliars an Modellpeptiden mit ungeschützten (A) und Phacm-geschützten (A') Cysteinresten: UPLC-Analyse vor (B/B') und nach (C/C') der Ligation und nach Abspaltung des Auxiliars (D/D'). Ungeschützte Cysteinreste sind unter den Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung nicht stabil und können durch Verwendung der Phacm-Schutzgruppe temporär maskiert werden. Bedingungen: a) c(Peptide) = 2 mM, 6 M GuHCl, 100 mM Na₂HPO₄, 20 mM TCEP, pH 7.5, 3 Vol.-% PhSH, RT, 2 h; b) c(Peptide) = 0.5 mM, 0.2 M TCEP, 0.8 M Morpholin, pH 8.5, 40°C, 20 h.

Gegenwart von *penicillin amidohydrolase* unter besonders milden Bedingungen (pH 7, 37°C) entfernt werden kann (Abbildung 36A').^[97] Dazu wurde das Cys(Phacm)-tragende Auxiliärpeptid **114** mit den Glycin-peptidthioester **22G** verknüpft und das 2ME-Auxiliär, durch Zugabe von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M), im direkten Anschluss an die Peptidligation bei 40°C entfernt. Die UPLC-Analyse der zweistufigen Reaktion bestätigte, dass der Phacm-geschützte Cysteinrest unter diesen Bedingungen vollständig stabil ist (Abbildung 36D'). Damit bietet die Phacm-Schutzgruppe eine einfache Möglichkeit zur temporären Maskierung von Cystein-Resten während der 2MPE-Auxiliär-Abspaltung.

4.2.8. Mechanistische Untersuchung der Auxiliär-Abspaltungsreaktion

Das 2MPE-Auxiliär wurde gezielt entworfen, um dessen Abspaltung über einen radikalischen Mechanismus zu ermöglichen (Abbildung 24). Die Entfernung des 2MPE-Grundgerüsts gelang bei hoher TCEP-Konzentration (Initiierung der Abspaltung durch radikalische Entschwefelung) besonders rasch und konnte in Gegenwart von TEMPO (Radikalfänger, siehe Kapitel 6.12.9.) gestoppt werden. Aufgrund dieser experimentellen Daten erschien es zunächst plausibel, dass die Reaktion über den postulierten radikalischen Mechanismus, wie in Abbildung 24 dargestellt, erfolgt. Um den vorgeschlagenen Mechanismus durch experimentelle Daten weiter zu unterstützen, sollte zunächst die Bildung von Styrol nachgewiesen werden, welches im Verlauf der Reaktion gebildet werden müsste. Durch Koinjektion von Referenzmaterial konnte mit Hilfe der UPLC-Analyse gezeigt werden, dass im Reaktionsgemisch der Auxiliär-Abspaltung Styrol fehlt. Es wurde vermutet, dass Styrol möglicherweise unter den Bedingungen der Auxiliär-Abspaltung weiteren Folgereaktionen unterliegt und deshalb nicht im Rahmen der UPLC-Analyse nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund sollte die Reaktion an dem Gly-Gly-verknüpften Ligationsprodukt **86GG** mit Hilfe der NMR-Spektroskopie detailliert untersucht werden (Abbildung 37). Durch einen Vergleich der NMR-Spektren des Auxiliär-tragenden Startmaterials **86GG** mit dem nativen Peptid **30** konnten die Signale im aromatischen Bereich (7.36-7.27 ppm) dem 2MPE-Auxiliär zugeordnet werden. Anschließend wurde das in deuteriertem Wasser gelöste, Auxiliär-tragende Peptid **86GG** (0.5 mM) mit TCEP (200 Äq., 100 mM) und Morpholin (800 Äq., 400 mM) versetzt. Nach 16 h Reaktionszeit, konnte mit Hilfe der NMR-Analyse eine Tieffeld-Verschiebung der Protonensignale (7.36-7.27 ppm→7.49-7.44 ppm) des 2MPE-zugehörigen

Phenylrestes nachgewiesen werden (Abbildung 37B'→C'). Aufgrund der hohen Intensität der TCEP- und Morpholin-Signale wurde die ^1H -NMR-Analyse des komplexen Reaktionsgemisches jedoch zusätzlich erschwert. Um die NMR-spektroskopische Charakterisierung der relevanten (und potentiell hydrophoben) Auxiliar-Fragmente zu erleichtern, wurden diese mit deuteriertem Chloroform extrahiert und dabei von den störenden, wasserlöslichen Bestandteilen (TCEP, Morpholin, peptidisches Material) abgetrennt. Im organischen Lösungsmittel wurden die *ortho*-, *meta*- und *para*-ständigen Protonen der Phenylgruppe als getrennte Signale beobachtet (Abbildung 37F). Wichtiger war jedoch die Identifizierung des charakteristischen Aldehyd-Signals, welches bei 9.97 ppm als Singulett detektiert wurde. Ferner konnte durch Integration der Protonensignale festgestellt werden, dass die Aldehyd- und Phenyl-Gruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit dem gleichen Molekül zugeordnet

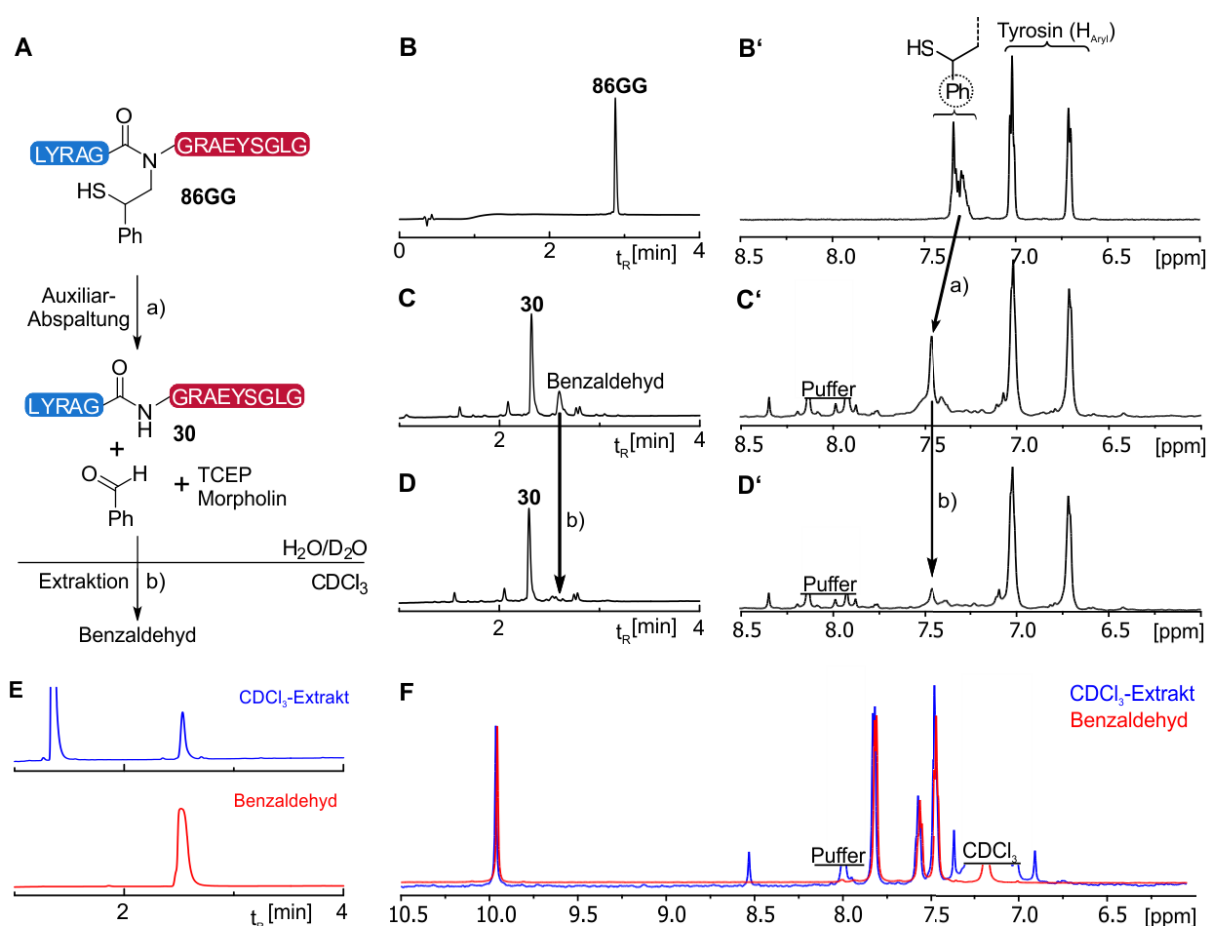


Abbildung 37: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars vom Gly-Gly-verknüpften Ligationsprodukt mit nachfolgender CDCl_3 -Extraktion für die NMR-Analyse (A): UPLC- und NMR-Analysen der wässrigen Phase vor (B/B') und nach der Entfernung (C/C') des Auxiliars, sowie nach der CDCl_3 -Extraktion (D/D'). UPLC (E) und NMR-Analyse (F) der CDCl_3 -Phase (blau) und von reinem Benzaldehyd (rot). Bedingungen: a) $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 100 mM TCEP , 400 mM Morpholin , $\text{pH } 8.5$, 40°C , 16 h , in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95/5, v/v); b) 3-fache Extraktion mit CDCl_3 .

werden konnten. Aufgrund der Struktur des 2MPE-Gerüsts und den spektroskopischen Daten, wurde vermutet, dass es sich bei der beobachteten Verbindung um Benzaldehyd handelt. Diese Vermutung konnte durch geeignete Referenzmessungen (0.5 mM Benzaldehyd in CDCl_3) NMR-spektroskopisch bestätigt werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe von UPLC-MS-basierten Referenzmessungen die zuvor unbekannte Komponente (*-markierter Peak, siehe beispielsweise Abbildung 30C''-F'', 36D'), welche im Verlauf der Auxiliar-Abspaltung gebildet wird, als Benzaldehyd identifiziert werden (m/z : gefunden: 107.0, berechnet: 107.0 (MH^+ , Summenformel: $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}$)). Da eine Umwandlung von Styrol in Benzaldehyd unter den Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung unwahrscheinlich erschien, musste auf Grundlage dieser Informationen der zuvor angenommene Mechanismus revidiert werden. Anhand der Entstehung von Benzaldehyd konnten zwei Schlussfolgerungen abgeleitet werden: 1.) die Reaktion verläuft über eine Spaltung der $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$ -Bindung am 2MPE-Gerüst; 2.) im Zuge der Auxiliar-Abspaltung wird am benzyliischen C-Atom die Thiol-Funktion entfernt und anschließend eine Carbonyl-Funktion generiert. Demnach erschien es plausibel, dass im ersten Schritt eine radikalische Entschwefelung der Thiol-Funktion erfolgt und dabei das Benzylradikal **118** gebildet wird, welches jedoch nicht, wie ursprünglich angenommen, einer β -Fragmentierungsreaktion unterliegt (Abbildung 38). Um die Entstehung von Benzaldehyd zu ermöglichen, könnte das kohlenstoffzentrierte Radikal eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff (Abbildung 38) eingehen. Sauerstoff ist in wässrigen Lösungen in ausreichend hoher Konzentration gelöst und reagiert bekanntermaßen rasch mit kohlenstoffzentrierten Radikalen unter Bildung der entsprechenden Peroxyalkylradikale.^[98] Demnach müsste die Reaktion des Benzylradikals **118** mit Sauerstoff das Peroxyalkylradikal **119** liefern. Es ist bekannt, dass Alkylperoxyradikale in Gegenwart von Phosphinen zügig desoxygeniert werden.^[98a, 99] Da die Abspaltung des 2MPE-Auxiliar einen hohen Überschuss an Phosphin (TCEP) erfordert, wurde angenommen, dass auf diesem Weg das Peroxyalkylradikal **119** in das Alkoxyradikal-Intermediat **120** überführt wird. Eine weitere Desoxygenierung durch TCEP sollte an diesem Intermediat aufgrund der relativ starken C-O-Bindung erschwert sein. Um dennoch eine weitere Stabilisierung zu ermöglichen, könnte das Radikalintermediat **120** eine β -Fragmentierungsreaktion eingehen. Dieser Reaktionsweg ist typisch für Sauerstoff-zentrierte Alkoxyradikale und wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben.^[100] Dabei kommt es zur homolytischen Spaltung der β -ständigen C-C-Bindung,

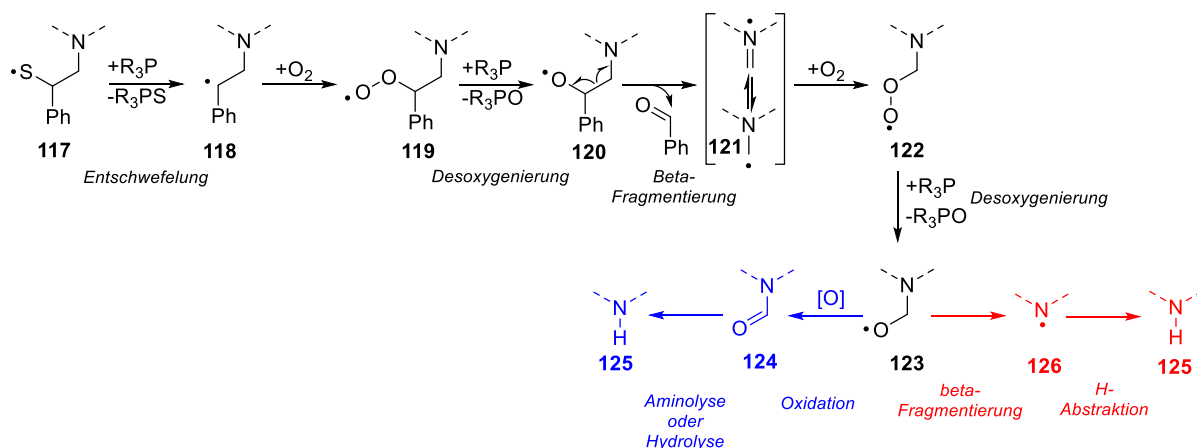


Abbildung 38: Mögliche Mechanismen zur oxidativen Abspaltung des 2MPE-Auxiliars: Die radikalische Entschwefelung und nachfolgende Reaktion des Benzylradikals mit Sauerstoff liefert das Peroxyalkylradikal, welches in Gegenwart von Phosphinen zum Alkoxyradikal umgesetzt wird. β -Fragmentierung führt zur Bildung von Benzaldehyd und dem Iminium-Radikal **121**, welches durch Reaktion mit Sauerstoff und anschließender Desoxygenierung in das Alkoxyradikal **123** überführt wird. Die finale Entfernung des verbleibenden Auxiliar-Fragments (CHO-Gruppe) kann entweder über die *N*-Formyl-Peptidspezies **124** (blau) oder über das Amidradikal **126** (rot) verlaufen.

wodurch ein wesentlich stabileres Kohlenstoff-zentriertes Radikal und der entsprechende Aldehyd (oder Keton) entsteht. Im Fall des postulierten Benzyl-oxo-Radikalintermediates **120** würde dieser Reaktionsweg zur Bildung des nachgewiesenen Benzaldehyds und des Amidoalkylradikals **121** führen. Es wurde vermutet, dass durch eine nachfolgende Reaktion des Radikal-Intermediates **121** mit Sauerstoff und TCEP (analog **118**→**120**; siehe Abbildung 38) das Alkoxyradikal **123** gebildet wird und dieses anschließend vom Peptidrückgrat entfernt wird. Allerdings war unklar, ob die Entfernung der Methylenoxy-Gruppe über eine β -Fragmentierung, unter Bildung von Formaldehyd und des Amid-Radikals **126**, erfolgt (Abbildung 38, roter Reaktionspfad) oder über eine *N*-Formyl-Peptidspezies **124** verläuft (Abbildung 38, blauer Reaktionspfad). Im letzteren Fall würde sich zunächst durch Oxidation die *N*-Formyl-Peptidspezies **124** bilden, welche zu diesem Zeitpunkt bereits in einer Vielzahl von Experimenten als Nebenprodukt (bzw. Zwischenprodukt) der 2MPE-Auxiliar-Abspaltung nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.2.3). Aufgrund des elektronenziehenden Effektes der Amid-Bindung müsste die Formyl-Gruppe eine hohe Reaktivität gegenüber Nukleophilen aufweisen. Demnach sollte unter den basischen Bedingungen der Formyl-Rest rasch durch Reaktion mit Morpholin (Aminolyse→*N*-Formyl-Morpholin) oder mit Wasser (Hydrolyse→Ameisensäure) vom Peptidrückgrat entfernt werden.

Um zu untersuchen, ob die Reaktion über das *N*-Formyl-Intermediat **124** oder das Amidradikal **126** verläuft, sollte die Auxiliar-Abspaltung an einem ^{13}C -markierten 2MPE-Gerüst mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert werden. Dazu wurde zunächst der ^{13}C -

markierte Aldehyd **128**, ausgehend von α , β - ^{13}C -markierter Phenyllessigsäure (**127**), dargestellt und dieser auf den N-Terminus des Harz-gebundenden Glycinpeptids **58** gekuppelt (Abbildung 39). Anschließend erfolgte die Verknüpfung des Auxiliärpeptids **129** mit dem Glycinpeptidthioester **22G**, wodurch das gewünschte ^{13}C -markierte Ligationsprodukt **130** erhalten wurde (79% Ausbeute). Im nächsten Schritt wurde das 2MPE-Auxiliar durch Behandlung mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) entfernt. Aus technischen Gründen (Einstellung des „Lock-Signals“) erfolgten die Messungen in einem Gemisch aus $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95/5, v/v). Nach 24 h wurde das erhaltene Reaktionsgemisch dreimal mit Chloroform extrahiert, um die zu untersuchenden und hydrophoben Auxiliär-Fragmente von der komplexen wässrigen Probenmatrix (Überschuss an Puffer und verbleibendem Peptid) abzutrennen. Im Anschluss wurden die beiden Phasen (wässrige und organische) mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie analysiert. Durch die Aufnahme von ^1H - ^{13}C korrelierten NMR-Spektren werden im sogenannten *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Experiment ausschließlich Protonen dargestellt, welche über eine δ -Bindung an einem ^{13}C -Atom gebunden sind. Aus diesem Grund müssten die Signale der ^{13}C -markierten Reaktionsprodukte des 2MPE-Auxiliärs deutlich intensiver (ca. Faktor 90) in den HSQC-Spektren erscheinen als unmarkierte Verbindungen. Auf diesem Weg sollte die Komplexität des zu analysierenden Spektrums reduziert und eine eindeutige Zuordnung der Fragmente als ehemalige Auxiliär-Bestandteile ermöglicht werden. Wie aus Abbildung 39B ersichtlich wird, konnten in der wässrigen Phase des Reaktionsgemisches drei Signale beobachtet werden, welche aufgrund ihrer hohen Signalintensität als ^{13}C -tragende Auxiliär-Fragmente identifiziert wurden. Durch Charakterisierung von geeignetem Referenzmaterial konnte aus dem HSQC-Spektrum abgeleitet werden, dass das 2MPE-Grundgerüst im Zuge der Auxiliär-Abspaltung in Ameisensäure (**131**) und *N*-Formylmorpholin überführt (**132**) wird. Die Entstehung dieser ^{13}C -markierten Carbonylverbindungen deutet darauf hin, dass im Verlauf der Auxiliär-Abspaltung ein Intermediat gebildet wird, welches in der Lage ist, eine Formyl-Gruppe auf Morpholin (\rightarrow *N*-Formyl-Morpholin) und das Lösungsmittel (Wasser \rightarrow Ameisensäure) zu übertragen. Durch die ^{13}C -Markierung kann der Ursprung der Formyl-Gruppe auf das 2MPE-Grundgerüst zurückgeführt werden. Anhand der identifizierten Reaktionsprodukte erschien es plausibel, dass die Auxiliär-Abspaltung über das *N*-formylierte Peptid-Intermediat **124** (Abbildung 38, blauer Pfad) verläuft, welches wie

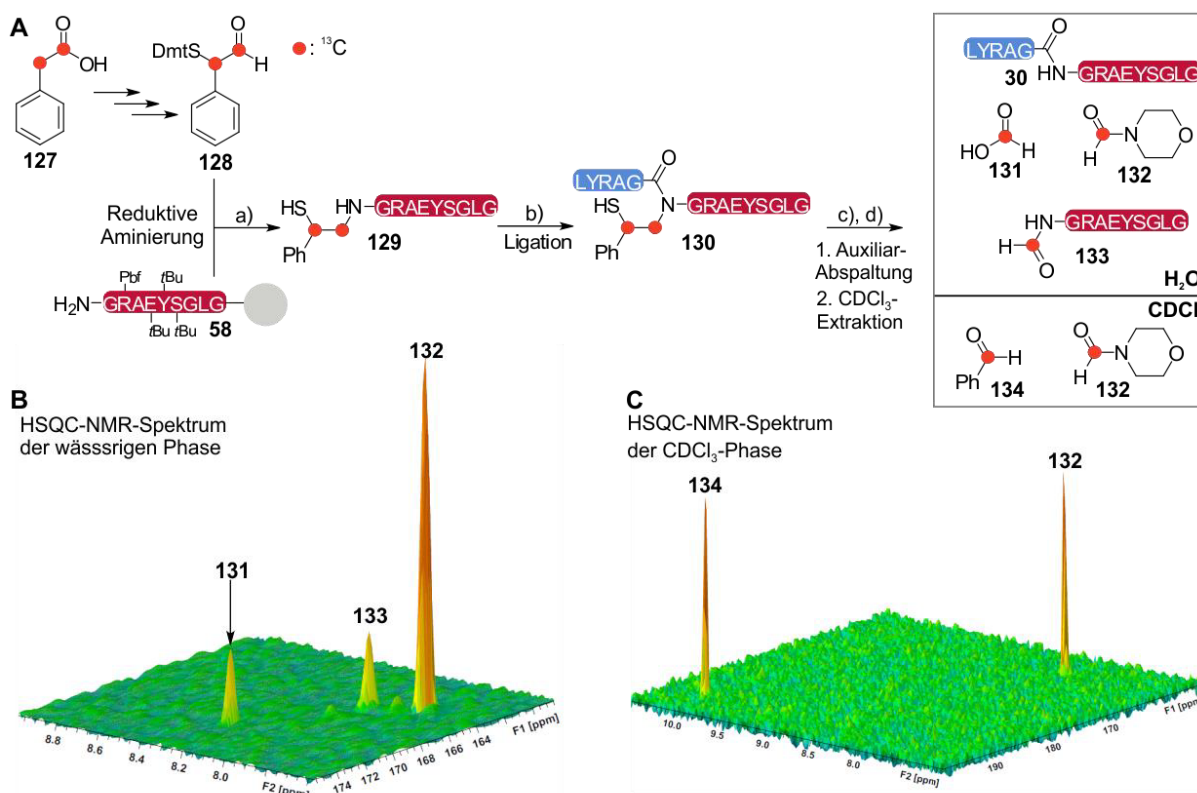


Abbildung 39: Untersuchung der Auxiliar-Abspaltung am ^{13}C -markierten 2MPE-Grundgerüst: Synthese des ^{13}C -markierten Auxiliär-Peptids **129** und dessen Anwendung in der ENCL (A). Nach der Auxiliar-Abspaltung wurde die wässrige Phase des Reaktionsgemisches mit CDCl_3 extrahiert, die beide Phasen NMR-spektroskopisch untersucht (B/C) und dabei die Verbindungen **131-134** identifiziert. Bedingungen: a) **83**, NaCNBH_3 , AcOH , NMP , $i\text{PrOH}$, RT; dann TFA/TIS , RT; b) $c(\text{Peptide}) = 2.5 \text{ mM}$, $200 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 20 mM TCEP , 3 Vol.-% PhSH , $\text{pH } 7.5$, RT; c) 0.2 M TCEP , 0.8 M Morpholin , $\text{pH } 8.5$, RT, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (95/5, v/v). Die Grafiken in den Abbildungen 39B/C wurden von Dr. André Dallmann bereit gestellt.

bereits erläutert, als potenter Formyl-Donor agieren sollte. Einen weiteren Hinweis für diesen Reaktionspfad lieferte die Bildung des *N*-formylierten Peptids **133**, welches in geringen Mengen (<5%, laut UPLC-Analyse) in der wässrigen Phase ebenfalls im HSQC-Experiment nachgewiesen werden konnte. Dieses Nebenprodukt resultiert vermutlich aus einer Spaltung der aufgebauten Gly-Gly-Amidbindung und nachfolgender teilweiser Entfernung des 2MPE-Auxiliars. Die Bildung des *N*-formylierten Peptids **133** kann dadurch erklärt werden, dass die Auxiliar-Abspaltung in diesem Fall an einem sekundären Amin und nicht wie im Normalfall an einem tertiären Amid erfolgt. Durch den verringerten elektronenziehenden Effekt ($\text{CHO-N(COR')R} \rightarrow \text{CHO-NHR}$) wird vermutlich der nukleophile Angriff von Morpholin (Aminolyse) oder Wasser (Hydrolyse) an der *N*-Formyl-Peptidspezies **133** verhindert, wodurch die Auxiliar-Abspaltungsreaktion auf dieser Stufe zum Erliegen kommt. Abschließend ist anzumerken, dass die 2D-NMR-Analyse der organischen Phase die Bildung von Benzaldehyd **134** und *N*-Formylmorpholin **132** ebenfalls bestätigte. Zusätzlich konnte die Entstehung des ^{13}C -markierten Benzaldehydes massenspektrometrisch nachgewiesen werden (m/z : gefunden: 108.1, berechnet: 108.1 (MH^+ , Summenformel: $^{12}\text{C}_6^{13}\text{CH}_7\text{O}$). Aus den

erhaltenen Ergebnissen wurde geschlussfolgert, dass die Entfernung des 2MPE-Auxiliars mit hoher Wahrscheinlichkeit über das Benzyloxyradikal **120** (Bildung von Benzaldehyd) und die *N*-Formyl-Peptidspezies **124** (Bildung von *N*-Formylmorpholin und Ameisensäure) verläuft.

Abschließend sollte geklärt werden, ob die Entfernung des 2MPE-Auxiliars durch Reaktion mit Sauerstoff erfolgt oder möglicherweise Wasser als Sauerstoff-Quelle fungiert. Um diese zwei möglichen Reaktionswege unterscheiden zu können, wurde zunächst versucht die sauerstoffhaltigen Auxiliar-Fragmente (Benzaldehyd, Ameisensäure, *N*-Formyl-Morpholin) im Verlauf der Auxiliar-Abspaltung mit einem schweren Sauerstoffisotop (^{18}O) zu markieren. Dazu wurde die Reaktion in schwerem Wasser (H_2^{18}O) und in einer $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durchgeführt. Allerdings konnte in keinem der beiden Experimente die Entstehung von ^{18}O -markierten Benzaldehyd durch UPLC-MS-Analysen nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass unter den sauren Bedingungen der UPLC-Analyse die ^{18}O -Markierung des Benzaldehyds, durch Hemiacetal-Bildung von Benzaldehyd mit Wasser der mobilen Phase, entfernt wird. Zusätzlich erwies sich der UPLC-MS-basierte Nachweis der anderen möglichen ^{18}O -markierten Reaktionsprodukte als schwierig (Ameisensäure: geringes Molekulargewicht und Zersetzung bei Ionisation; *N*-Formylmorpholin: Koelution mit Morpholin und TCEP). Aus diesem Grund wurde versucht, die Rolle von Wasser und Sauerstoff für die 2MPE-Auxiliar-Abspaltung durch Variation der Reaktionsbedingungen aufzuklären. Es konnte gezeigt werden, dass die Entfernung des 2MPE-Auxiliars in reinem Methanol mit einer nahezu identischen Reaktionsgeschwindigkeit wie in Wasser erfolgt (Abbildung 40B) und unter diesen Bedingungen ebenfalls Benzaldehyd gebildet wird (siehe Kapitel 6.12.9.). Daraus wurde abgeleitet werden, dass zur erfolgreichen Entfernung des Auxiliars kein Wasser benötigt wird und daher Sauerstoff, mit hoher Wahrscheinlichkeit, als notwendige Komponente an der Reaktion beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls die Reaktion unter Ausschluss von Sauerstoff erprobt. Die Verwendung einer entgasten Reaktionslösung unter Argon-Atmosphäre führte jedoch ebenfalls zur Bildung des nativen Peptids **30** (Abbildung 40D). Es wurde vermutet, dass trotz Anwendung der Schlenktechnik („freeze-pump-thaw“-Methode) keine vollständige Entfernung von Sauerstoff aus der wässrigen Lösung erreicht wurde. Allerdings führte der reduzierte Sauerstoff-Gehalt zur verstärkten Bildung der *N*-Methylpeptidspezies **136**. Diese Beobachtung lässt sich anhand des vorgeschlagenen Mechanismus (Abbildung 38/40) der 2MPE-Auxiliar-Abspaltung erklären:

Demzufolge verläuft die Reaktion über das Amidomethylradikal **121**, welches bei geringer Sauerstoff-Konzentration vermutlich nicht ausreichend schnell umgesetzt wird und daher die H-Abstraktion als Konkurrenzreaktion (Bildung der *N*-Methylpeptidspezies **136**) begünstigt wird (Abbildung 40C). Zusätzlich konnten weitere Nebenprodukte detektiert werden, welche den vorgeschlagenen Mechanismus weiter unterstützen: Dazu zählen beispielsweise die bereits erwähnten *N*-Acetophenon- und *N*-Methyl-tragenden Peptide (**135/136**), welche möglicherweise aus einer Oxidation des Alkoxyradikals **121** (\rightarrow **135**) bzw. einer H-Abstraktion der Aminoalkylradikal-Peptidspezies **121** (\rightarrow **136**) resultieren und damit als indirekter Nach-

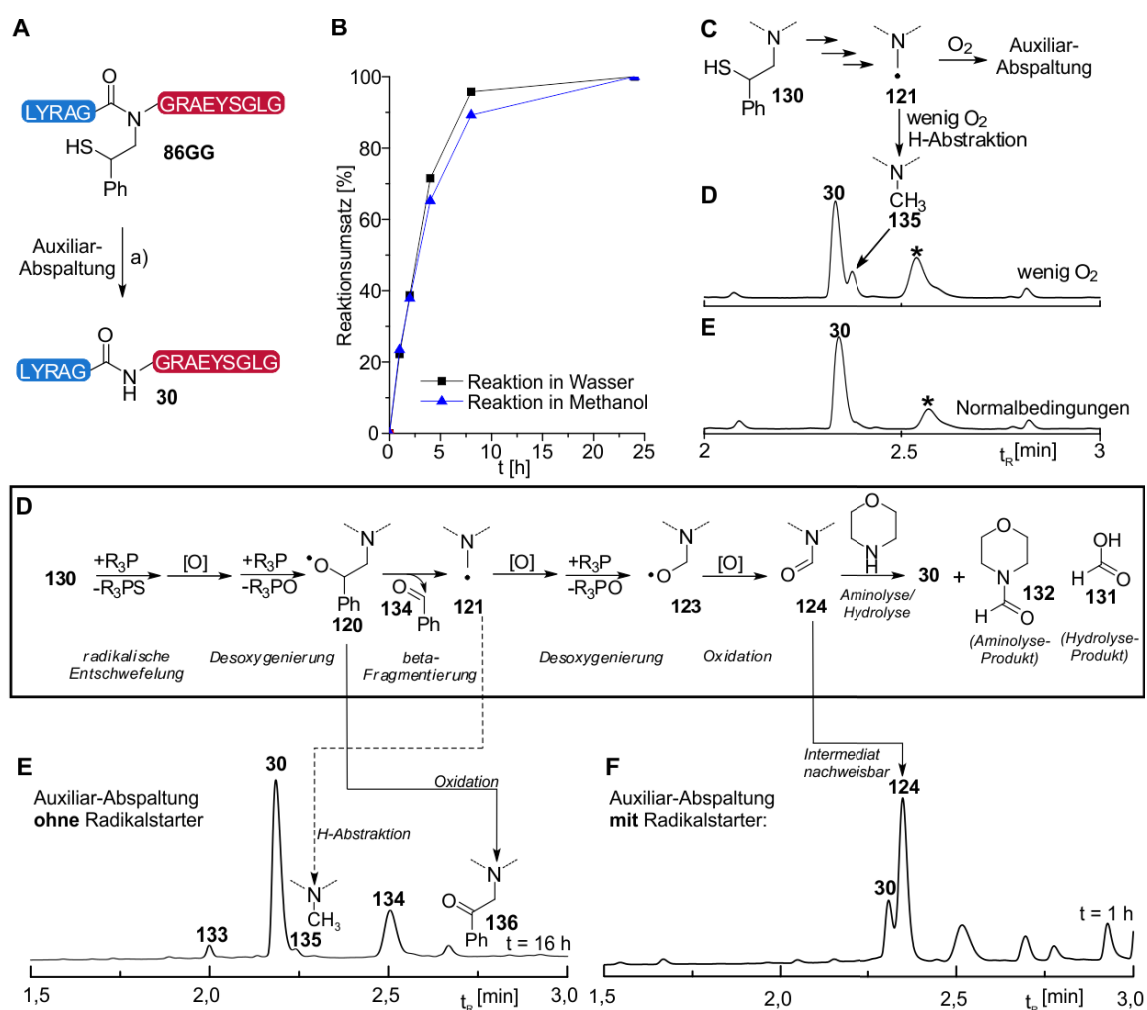


Abbildung 40: Untersuchung der 2MPE-Auxiliar-Abspaltung bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen (A): Zeitlicher Verlauf der Reaktion in Wasser und Methanol. Mögliche Bildung (C) der *N*-Methylpeptidspezies **136** durch H-Abstraktion bei geringer Sauerstoff-Konzentration. UPLC-Analysen der Auxiliar-Abspaltung mit wenig Sauerstoff (D) und unter Normalbedingungen (E). Revidierter vorgeschlagener Mechanismus der 2MPE-Auxiliar-Abspaltung (D). UPLC-Analysen der Auxiliar-Abspaltung ohne Radikalstarter (E) und mit 0,2 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (F). Bedingungen: a) Reaktion in Wasser/Methanol (B): $c(\text{Peptid}) = 0,5 \text{ mM}$, 0,4 M TCEP, 1,2 M Morpholin, RT; Reaktion (C-E) mit wenig O_2 /Normalbedingungen: $c(\text{Peptid}) = 0,5 \text{ mM}$, 0,2 M TCEP, 0,8 M Morpholin, 40°C, 4,5 h. (E-F): $c(\text{Peptid}) = 0,5 \text{ mM}$, 0,2 M TCEP, 0,8 M Morpholin, pH 8,5, RT.

weis der radikalischen Intermediate gewertet werden können (Abbildung 40D/E). Schließlich konnte das postulierte *N*-Formyl-Peptidintermediat **124** durch Verwendung eines Radikalstarters ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) im Zuge der Auxiliar-Abspaltung massenspektroskopisch mit Hilfe der UPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 40D/F). Unter diesen Bedingungen verlaufen die Radikalreaktionen scheinbar schneller als die Aminolyse. Daraus kann abgeleitet werden, dass in Abwesenheit eines Radikalstarters die Aminolyse wesentlich schneller erfolgt als die vorausgehenden radikalischen Reaktionschritte (Entschwefelung, Reaktion mit Sauerstoff, Desoxygenierung, β -Fragmentierung) und daher das *N*-Formyl-Intermediat **124** unter „Standardbedingungen“ nicht beobachtet wird. Aufgrund der nachgewiesenen Reaktionsprodukte und dem Ausschluss von Wasser als Sauerstoffquelle erschien es plausibel, dass die Auxiliar-Abspaltung über die postulierten Intermediate **118-124** (Abbildung 40D) verläuft. Dabei wird das Benzyloxyradikal **120** vermutlich durch radikalische Entschwefelung des Startmaterials **130** und der nachfolgenden Reaktion mit Sauerstoff sowie TCEP (Desoxygenierung) erhalten. Im letzten Schritt wird die verbleibende Formyl-Gruppe (in **124**) durch Aminolyse (oder Hydrolyse) entfernt und dabei das native Peptid **30** sowie *N*-Formylmorpholin **132** (oder Ameisensäure **131**) erhalten.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die Entfernung des 2MPE-Auxiliars nicht, wie zuvor angenommen, über eine β -Fragmentierung des Benzyldradikals **78** unter Freisetzung von Styrol erfolgt (Abbildung 24). Der Nachweis von Benzaldehyd, *N*-Formylmorpholin und Ameisensäure als Auxiliar-Fragmente deutet darauf hin, dass die Entfernung des 2MPE-Gerüsts über eine Spaltung der $\text{C}^\alpha\text{-C}^\beta$ -Bindung verläuft und dabei vermutlich Sauerstoff für den Aufbau der Carbonylfunktionen (Bz-CHO, Morpholin-CHO, H-CO₂H) verbraucht wird. Demzufolge verläuft die Auxiliar-Abspaltung möglicherweise über sauerstoffzentrierte Peroxyalkylradikale (**119/122**), welche durch Reaktion der intermediär gebildeten kohlenstoffzentrierten Radikale (**118/121**) mit Sauerstoff gebildet werden und anschließend in Gegenwart von Phosphinen desoxygeniert werden. Die dabei erhaltenen Alkoxyradikale (**120/123**) werden vermutlich durch β -Fragmentierung (Bildung von Benzaldehyd) und Oxidation (Bildung der *N*-Formyl-Peptidspezies **124**) weiter umgesetzt. Im letzten Schritt erfolgt die Aminolyse der *N*-Formyl-Peptidspezies **124**, wodurch das 2MPE-Gerüst restlos entfernt wird.

4.2.9. Substitution der Phenylgruppe: Synthese und Einsatz des 2-Mercapto-ethyl- und des 2-Mercapto-propyl-Auxiliars für die ENCL

Wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben, wurde neben dem 2MPE-Auxiliar (**1e**) zusätzlich der Einsatz des 2-Mercapto-ethyl-Auxiliars (**1f**; Abkürzung: 2ME) und des 2-Mercapto-propyl-Auxiliars (**1g**; Abkürzung: 2MP) untersucht. Es wurde angenommen, dass die unterschiedliche Struktur der Hilfsmoleküle die ENCL-Reaktivität der Auxiliare beeinflussen sollte. Hinsichtlich der Auxiliar-Abspaltungsreaktion wurde vermutet, dass die beiden Grundgerüste analog zum 2MPE-Auxiliar über einen oxidativen Mechanismus (Abbildung 38/39: Ph = H bzw. CH₃) entfernt werden. Im Gegensatz zum 2MPE-Auxiliar müsste die Reaktion an diesen Grundgerüsten über ein weniger stabiles Alkylradikal verlaufen und dabei Formaldehyd (2ME) bzw. Acetaldehyd (2MP), anstelle von Benzaldehyd (2MPE), freigesetzt werden. Damit besitzen die alkyllischen Radikalintermediate und Auxiliar-Fragmente keine Möglichkeit durch π -Konjugation stabilisiert zu werden.

Zunächst erfolgte die Synthese der Auxiliar-Vorläufermoleküle **139** und **142** (Abbildung 41). Die Darstellung von *S*-Trt-2-Mercaptoethanal (**138**) wurde bereits in Arbeiten von Dr. Christian Haase beschrieben.^[51] Dazu wurde Bromacetyl bromid (**137**) zuerst mit *N*, *O*-Dimethylhydroxylamin und anschließend mit Tritylmercaptan umgesetzt (71% Ausbeute). Im letzten Schritt wurde das erhaltene *S*-Trt-geschützte Weinrebamid **138** mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert und dabei der gewünschte Aldehyd **139** erhalten (87% Ausbeute). Für die Synthese des 2MP-Auxiliar-Vorläufermoleküls **142** wurde 2-Brompropionsäure (**140**) zunächst mit Kaliumxanthogenat umgesetzt und anschließend die verbleibende Carbonsäure in das Weinrebamid **141** überführt. Der Xanthogenatester **141** wurde durch Reaktion mit Piperidin gespalten und das dabei erhaltene Thiol ohne weitere Aufreinigung mit Tritylchlorid alkyliert. Auch in diesem Fall erwies sich die Reduktion des Weinrebamids mit Lithiumaluminiumhydrid als zuverlässige Methode zur Darstellung des gewünschten *S*-Trt-geschützten Aldehyds **142**. Im Anschluss erfolgte die Synthese der Auxiliar-Peptide **143Z** (Z = G, N, F) und **144Z** (Z = G, N) durch reduktive Aminierung der Harz-gebundenen Modellpeptide **58Z** mit den entsprechenden Auxiliarvorläufermolekülen **139** bzw. **142** (Abbildung 41B-C).

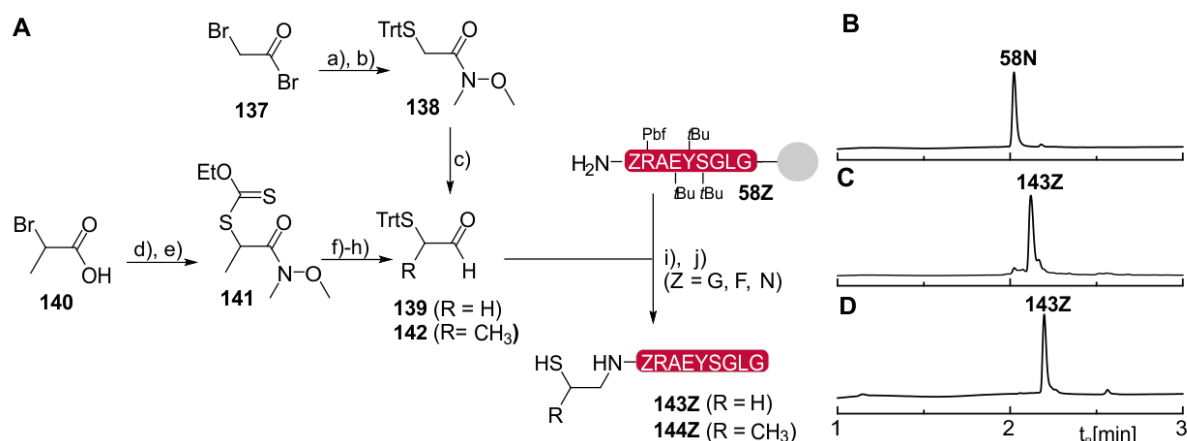


Abbildung 41: Synthese und Anwendung der S-Trt-geschützten Aldehyde **139/142** für die Synthese der Auxiliärpeptide **143Z** und **144Z** (A): UPLC-Analyse vor (B) und nach (C) der reduktiven Aminierung sowie des gereinigten Auxiliärpeptids **143N** (D). Bedingungen: a) N,O HNMeOMe*HCl, DIPEA, DCM, 0°C, b) Trt-SH, DIPEA, DCM, RT, 71% (über zwei Stufen); (c) LiAlH₄, THF, -78°C, 80%; d) EtOCSSK, Aceton, RT; e) N, O HNMeOMe*HCl, EDC*HCl, NEt₃, DCM, 0°C→rt, 38% (zwei Stufen); f) Piperidin, DCM, 0°C; g) Trt-Cl, NEt₃, DCM, RT, 58% (über zwei Stufen); (h) LiAlH₄, THF, -78°C, 96%; (i) **139** oder **142**, NaCNBH₃, AcOH, NMP, MeOH, RT; (j) TFA/TIS/Wasser, RT, 17-39% (zwei Stufen).

Die ersten Arbeiten konzentrierten sich auf die 2ME-Auxiliar-tragenden Modellpeptide **143Z**. Diese wurden in ENCL-Reaktionen zum Aufbau der Leu-Gly-, Ala-Asn- und Leu-Asn-Amidbindung in **145XZ** eingesetzt und dabei der zeitliche Verlauf der Verknüpfungsreaktionen analysiert (Abbildung 42). Im Fall der Leu-Gly-Ligation wurde nach 75 Minuten eine Ausbeute von 50% erreicht. Damit ermöglicht das 2ME-Auxiliars zwar schnellere Verknüpfungsreaktion als die zuvor untersuchten 6NP- und 5NP-Auxiliare (6NP: t_{50} = 188 min, 5NP: t_{50} = 480 min). Allerdings benötigte das Phenyl-substituierte 2MPE-Auxiliar nur 55 Minuten, um ebenfalls 50% Produkt zu liefern. Von Nachteil zeigte sich die Enschwefelung oder teils komplette Entfernung des 2ME-Grundgerüsts (Abbildung 42F: „Zersetzung von **144G**“), wodurch die Ausbeute der Leu-Gly-Peptidligation auf 70% begrenzt wurde. Interessanterweise wurden diese Nebenreaktionen jedoch ausschließlich an dem Auxiliärpeptid **144G** mit N-terminalen Glycinrest beobachtet. Anschließend sollte ein Vergleich des 2MPE- und des 2ME-Auxiliars anhand der Reaktionsgeschwindigkeit in Ala-Asn und Leu-Asn-Peptidligationen erfolgen. Um eine vollständige Löslichkeit der hydrophoben Peptidfragmente zu gewährleisten wurden die Peptidligationen bei niedriger Konzentration ($c(\mathbf{144N}) = 2$ mM) durchgeführt. Aufgrund der verringerten ENCL-Reaktivität des 2ME-Auxiliars wurden zusätzlich die jeweiligen Peptidthioester (**22A/22L**) im Überschuss (2 Äq.) eingesetzt. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass die Verwendung des 2ME-Auxiliars ebenfalls ENCL-Reaktionen an sterische anspruchsvollen Verknüpfungsreaktionen

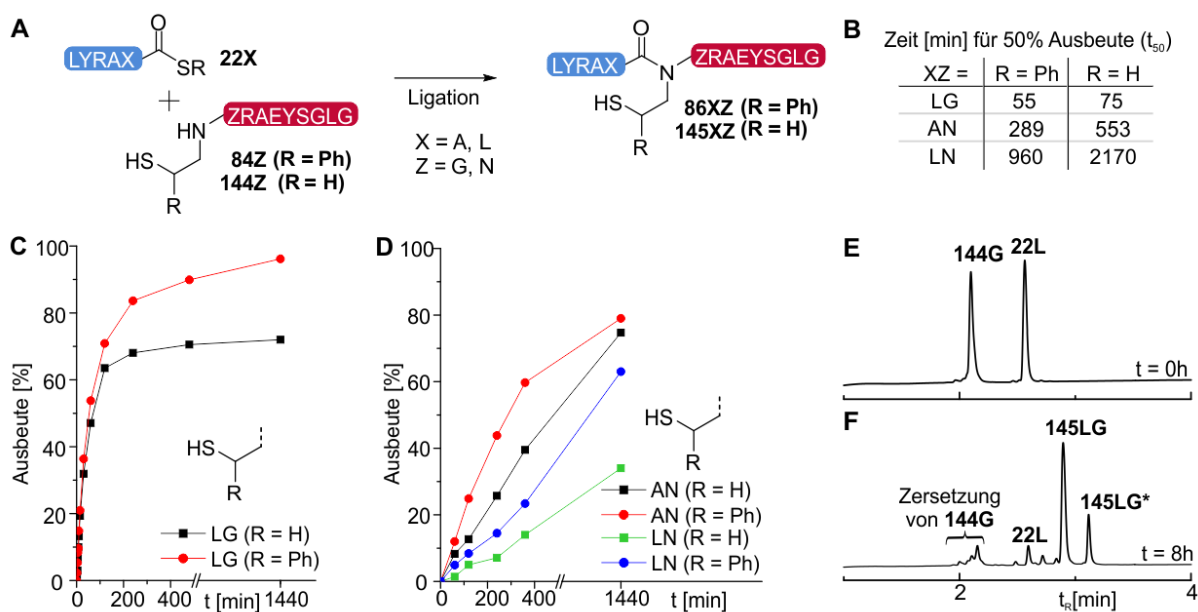


Abbildung 42: Vergleich des 2MPE- ($R = Ph$) und des 2ME-Auxiliars ($R = H$) in ENCL Reaktionen (A). Ermittelte t_{50} -Werte (B) und zeitlicher Verlauf der Peptidligationen (C/D). UPLC-Analyse vor (E) und nach (F) der Peptidligation des Thioesters 22L mit Auxiliarpeptid 143G. Bedingungen: Peptidligationen erfolgten in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% $PhSH$, pH 7.5) bei RT mit 2-5 mM-Konzentration der Auxiliarpeptide (LG-Ligation: 5 mM; AN/LN-Ligation: 2 mM); 145LG*: S- und N-acetyliertes Produkt, welches durch Reaktion des Ligationsproduktes mit verbleibenden Peptidthioester gebildet wird.

jenseits Glycin ermöglicht. Diese Erkenntnis war überraschend, da das 2ME-Grundgerüst als erstes N^α -Auxiliar bereits 1996 von Kent *et al.* vorgestellt wurde und dabei dessen Anwendung nur an einfachen Gly-Gly-Schnittstellen demonstriert wurde.^[8] Vermutlich beschränkten sich die Untersuchungen dieser Arbeit nur auf einfache Gly-Gly-Schnittstellen, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Möglichkeit bzw. Strategie zur Abspaltung des Auxiliars vorhanden war. Im Vergleich zum dem 2MPE-Auxiliar benötigte das 2ME-Auxiliar fast die doppelte Zeit um 50% des Ala-Asn-verknüpften Ligationsproduktes 145AN zu liefern (2ME: $t_{50} = 553$ min; 2MPE: $t_{50} = 289$ min). An der sterisch anspruchsvollen Leu-Asn-Schnittstelle ermöglichte das 2ME-Auxiliar nach 24 h Reaktionszeit eine deutlich verringerte Ausbeute (34%, $t_{50} = 90$ h) als das 2MPE-Auxiliar (63% Ausbeute; $t_{50} = 40$ h). Damit konnte gezeigt werden, dass die Verknüpfungsreaktionen langsamer am 2ME-Auxiliar verliefen als im Vergleich zu dem 2MPE-Auxiliar. Dieses Ergebnis war überraschend, da ursprünglich angenommen wurde, dass mit abnehmenden sterischen Anspruch des Hilfsmoleküls ein effizienter S→N-Acytransfer ermöglicht wird und damit die Verknüpfungsreaktionen zunehmend schneller verlaufen würden. Im Fall des 2ME-Gerüsts ist der β -Substituent ($R = H$) deutlich kleiner als der Phenyl-Substituent des 2MPE-Auxiliars. Zusätzlich wird die ENCL-Reaktion am 2ME-Auxiliar durch ein primäres Thiol vermittelt, wodurch die Thiol-Austausch-Reaktion mit dem

Peptidthioestern gegenüber dem 2MPE-Auxiliar (sekundäres Thiol) eine geringere sterische Hinderung erfahren sollte. Es wurde vermutet, dass die gesteigerte Reaktivität des 2MPE-Auxiliars auf zwei Ursachen zurückgeführt werden kann: 1.) im Vergleich zum 2ME-Auxiliar sollte die Acidität des benzylichen Thiols am 2MPE-Auxiliar erhöht sein (analog: $\text{PhCH}_2\text{-SH}$ ($\text{pK}_s = 9.4$)^[101]/ $n\text{Bu-SH}$ ($\text{pK}_s = 10.5$))^[102] und damit ein höherer Anteil der nukleophilen Thiolatspezies für die Thiol-Austauschreaktion unter den NCL-Bedingungen (pH 7.5) zur Verfügung stehen; 2.) die Phenyl-Gruppe überführt das 2MPE-Auxiliar-Gerüst bzw. das Thioester-verknüpfte Intermediat in ein „reaktives Rotamer“, wodurch die Geschwindigkeit der intramolekularen Cyclisierungsreaktion ($\text{S} \rightarrow \text{N}$ -Acyltransfer) erhöht wird. Diese durch Substituenten beschleunigten Cyclisierungsreaktionen wurden bereits an einer Vielzahl von Substraten beschrieben.^[103] Eine mögliche Erklärung für diesen Substituenten-Effekt ist in Abbildung 43 dargestellt: Zur Überführung des Thioester-Intermediates in das Amid-verknüpfte Ligationsprodukt muss die Carbonyl-Gruppe des Peptidthioesters und das sekundäre Amin des Auxiliarpeptids in räumlicher Nähe gebracht werden. Diese Voraussetzung ist nur im reaktiven Rotamer **147/148** (*gauche*-Anordnung) gegeben. Im Fall des 2MPE-Auxiliars ist zu erwarten, dass aufgrund der ungünstigen Wechselwirkung zwischen der Phenylgruppe und dem sekundären Amin in der gestaffelten Anordnung **146** das reaktive Rotamer **147** bevorzugt populiert werden sollte. Im Gegensatz dazu müsste das 2ME-Auxiliar bevorzugt die gestaffelten und damit unproduktive Anordnung **149** einnehmen.

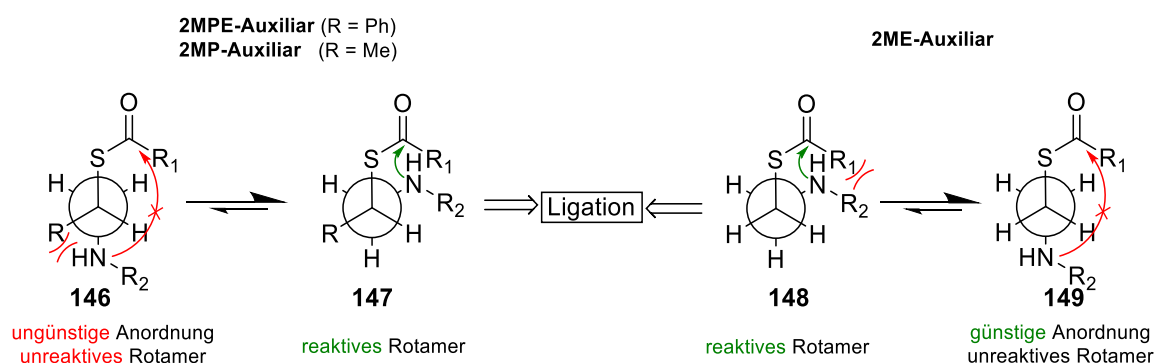


Abbildung 43: Mögliche Erklärung der erhöhten ENCL-Reaktivität von β -substituierten 2-Mercapto-ethyl Auxiliaren: Die Wechselwirkung zwischen dem β -Substituenten ($\text{R} = \text{Me}, \text{Ph}$) und dem sekundären Amin verschiebt das Gleichgewicht auf die Seite des reaktiven Rotamers **147**. Im Fall des 2ME-Auxiliars ist die gestaffelte Anordnung **149** bevorzugt, wodurch die Peptidligation vergleichsweise langsam erfolgt. Abbildung in Anlehnung an den Übersichtsartikel von Jung und Piizzi.^[103]

Im nächsten Schritt wurde die Abspaltung des 2ME-Auxiliars untersucht. Dazu wurde das Gly-Gly-verknüpfte Ligationsprodukt mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.1 M) und Morpholin (0.4 M) bei 40°C inkubiert. Innerhalb von 16 h erfolgte unter diesen Bedingungen

eine nahezu vollständige Entfernung (98% Umsatz) des 2ME-Grundgerüsts unter Bildung des gewünschten nativen Peptids **30** als Hauptprodukt (Abbildung 44C). Mit einer Selektivität von 75% verlief die Reaktion ähnlich erfolgreich wie am sequenzanalogen 2MPE-Ligationsprodukt **86GG** (81% Selektivität). Wie schon zuvor für das 2MPE-Auxiliar beobachtet, wurde die Reaktion in Gegenwart des Radikalfängers TEMPO vollständig unterdrückt (Abbildung 44D). Demzufolge scheint auch die Abspaltung des 2ME-Auxiliars über einen radikalischen Mechanismus zu verlaufen. Da glycinhaltige Verknüpfungsstellen schon durch zuvor beschriebene Auxiliare adressiert werden konnten, sollte die Entfernung des 2ME-Auxiliars an anspruchsvollen Substraten getestet werden. Dazu wurde die Reaktion an den gereinigten Ligationsprodukten **145QF** und **145AN** untersucht. An diesen Verknüpfungsstellen hatte sich zuvor die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars als problematisch erwiesen, da die Bildung der *N*-Formyl-Nebenprodukte **89QF/89AN** erst bei hoher TCEP- und Morpholin-Konzentration ausreichend reduziert werden konnte (Kapitel 4.2.3). Die Behandlung des 2ME-Auxiliar-tragenden Ligationsproduktes **145QF** mit wässrigen Lösungen von TCEP (0.1-0.4 M) und Morpholin (0.4-1.6 M) bei Raumtemperatur lieferte jedoch nur eine geringe Ausbeute des gewünschten nativen Peptids **30QF** (Selektivität < 34%). Im Rohprodukt konnten signifikante Mengen (28-36%, Abbildung 44F/G) des Peptidfragments **150** nachgewiesen werden. Zusätzlich lieferte die Reaktion das unerwünschte *N*-formylierte native Peptid **30QF*** (15-19%), wie es bereits im Fall des 2MPE-tragenden, sequenzanalogen Modellpeptid **86QF** beobachtet wurde (Abbildung 44F/G). Am Ala-Asn-verknüpften Ligationsprodukt **145AN** erfolgte die Abspaltung des 2ME-Auxiliars ebenfalls mit geringer

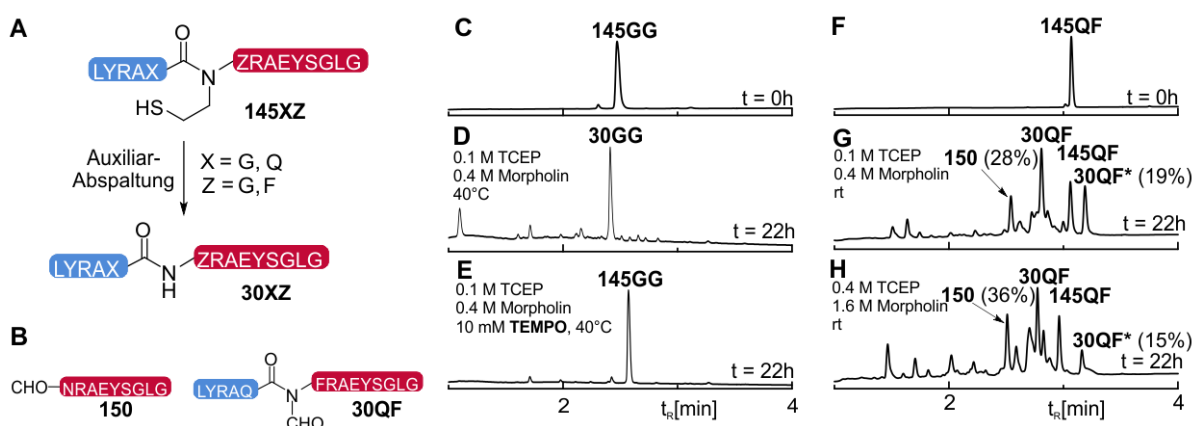


Abbildung 44: Abspaltung (A) des 2ME-Auxiliars vom gereinigten Ligationsprodukt **145XZ** und vermutete Strukturen (B) ausgewählter Nebenprodukte. UPLC-Analysen vor (C/F) und nach (D,E,G,H) der Auxiliar-Abspaltung. Die Reaktion wird in Gegenwart von TEMPO verhindert (E) und führt im Fall des Gln-Phe-verknüpften Ligationsproduktes **145QF** zur Spaltung der zuvor aufgebauten Amidbindung (F/G). Bedingungen: Siehe Abbildungen; Peptidkonzentration = 0.5 mM.

Selektivität (53%), da die Reaktion von der Spaltung der Ala-Asn-Amidbindung (32%) und der Bildung des *N*-formylierten Nebenproduktes (12%) begleitet wurde (siehe Kapitel 6.13.5). Demnach ist die unerwünschte Spaltung der aufgebauten Amidbindung am 2ME-Gerüst deutlich ausgeprägter als im Fall des 2MPE-Auxiliars (<5%). Es wurde vermutet, dass an den 2ME-Auxiliar tragenden Ligationsprodukten ein rascher N→S-Acyltransfer unter den Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung (pH 8.5) erfolgt, da die primäre Thiofunktion vermutlich einfacher an der tertiären Amidbindung angreifen kann als im Vergleich zu dem sekundären Thiol des 2MPE-Auxiliars. Die dabei gebildete Thioester-Peptidspezies sollte bei pH 8.5 zügig hydrolysiert werden und damit die aufgebaute Amidbindung gespalten werden. Aufgrund dieser Nebenreaktion wurde der Einsatz des 2ME-Auxiliars für die chemische Proteinsynthese nicht weiter untersucht.

Interessant schien es, den Einfluss der Substitution an Position 2 der Mercaptoethylgruppe näher zu betrachten. Aus diesem Grund wurde das 2MP-Auxiliar mit dem Phenyl-substituierten 2MPE-Grundgerüst am Beispiel der Ala-Asn-Ligation (Abbildung 45A) verglichen. Die Analyse des zeitlichen Verlaufes der beiden Verknüpfungsreaktionen zeigte, dass die Auxiliare ähnlich rasche Peptidligationen vermitteln (siehe Abbildung 45B). Nach 24 h lieferte das 2MPE-Auxiliar eine Ausbeute von 58% ($t_{50} = 18.8$ h) und das 2MP-Auxiliar eine Ausbeute von 62% ($t_{50} = 16.0$ h). Unter Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Auxiliare (2'-substituierte 2-Mercapto-ethyl-Struktur) erscheint der nahezu identische Reaktionsverlauf zunächst plausibel. An beiden Grundgerüsten werden die Verknüpfungs-

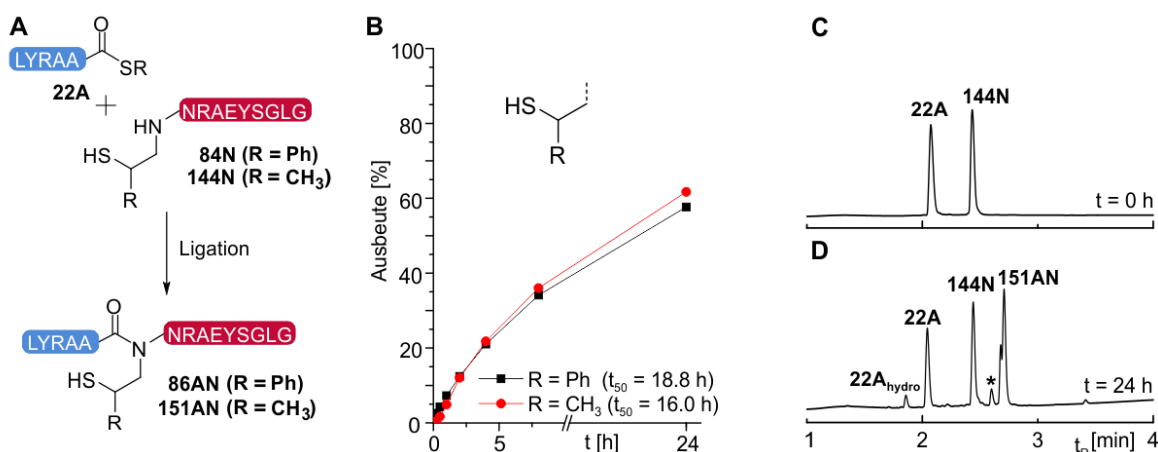


Abbildung 45: Vergleich des 2MPE- ($R = Ph$) und des 2MP-Auxiliars ($R = Me$) am Beispiel der Ala-Asn-Verknüpfungsreaktion (A). Zeitlicher Verlauf und ermittelte t_{50} -Werte der Ala-Asn Peptidligationen (B). UPLC-Analyse vor (C) und nach (D) der Peptidligation des Thioesters 22A mit Auxiliarpeptid 144N. Bedingungen: Peptidligationen erfolgten in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT mit 5 mM Konzentration der Auxiliarpeptide; *: Thioester-verknüpftes Ligationsprodukt.

reaktionen über sekundäre Thiole vermittelt. Angesichts des geringeren sterischen Anspruches der Phenylgruppe und der höheren Acidität der Mercaptogruppe im 2MPE-Auxiliar hätte man erwarten können, dass das 2MPE-Auxiliar reaktiver ist als das 2ME-Auxiliar. Plausibel erscheint jedoch, dass die Reaktivität der Auxiliare weniger durch die Acidität oder den sterischen Anspruch der Thiol-Funktion bestimmt wird, sondern hauptsächlich auf den beschleunigenden Effekt des β -Substituenten (Abbildung 43, R = Ph, CH₃) zurückzuführen ist. Demnach würden die nahezu identischen Reaktionsgeschwindigkeiten des 2MPE- und des 2MP-Auxiliars bedeuten, dass beide Substituenten (R = Ph, CH₃) in ähnlichem Maße das Gleichgewicht auf die Seite des reaktiven Rotamers **147** verschieben.

Im Vergleich zu dem 2ME-Auxiliar kann abgeleitet werden, dass die formale Substitution eines H-Atoms (2ME-Auxiliar) durch eine Methyl-Gruppe (2MP-Auxiliar) schnellere ENCL-Reaktionen ermöglicht, obwohl die sterische Abschirmung zunehmen sollte. Demzufolge erscheint es plausibel, dass die erhöhte ENCL-Reaktivität maßgeblich auf die Anwesenheit des β -ständigen Substituenten zurückzuführen ist, welcher vermutlich die Anordnung des Thioester-verknüpften Ligationsproduktes in Form des reaktiven Rotamers (Abbildung 43, Struktur **147**) begünstigt und damit die Cyclisierungsreaktion (S \rightarrow N-Acyltransfer) beschleunigt. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass durch Verwendung von 2'-substituierten 2-Mercapto-ethyl-Grundgerüsten besonders leistungsfähige N ^{α} -Auxiliare erhalten werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Verwendung des 2MP-Auxiliars einen zuverlässigen Zugang zu sterisch anspruchsvollen Ligationstellen ermöglichte, sollte anschließend dessen Abspaltung untersucht werden (Abbildung 46A). Dazu wurde zunächst das gereinigte Gly-Gly-verknüpfte Ligationsprodukt **151GG** mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.1 M) und Morpholin (0.4 M) bei 40°C behandelt. Nach 24 h konnte eine erfolgreiche Entfernung des 2MP-Auxiliars nachgewiesen werden, wobei das gewünschte native Peptid **30** mit einer Selektivität von 78% gebildet wurde (Abbildung 46C). Damit verläuft die Auxiliar-Abspaltung unter diesen Bedingungen am sequenzanalogen Modellpeptid für alle drei untersuchten 2-Mercapto-ethyl-basierten Grundgerüste mit vergleichbarer Selektivität (2MPE: 82%; 2ME: 75%; 2MP: 78%). Durch Verwendung einer höheren Konzentration von

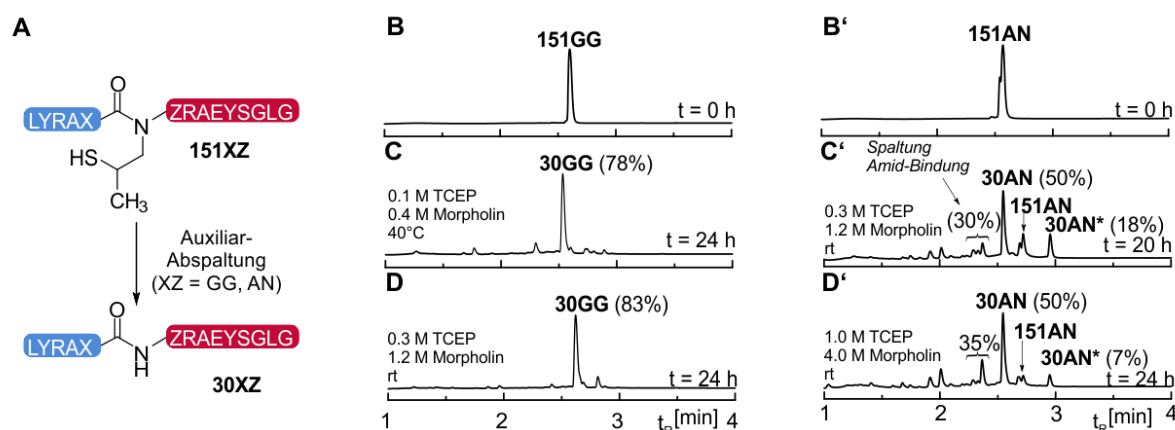


Abbildung 46: Abspaltung des 2MP-Auxiliars vom gereinigten Ligationsprodukt **151XZ** (A) und vermutete Strukturen ausgewählter Nebenprodukte (B). UPLC-Analysen vor (B/B') und nach (C, D, C', D') der Auxiliar-Abspaltung. Im Fall des Ligationsproduktes **151AN** wird die Spaltung der Ala-Asn-Peptidbindung beobachtet (C'/D'). Bedingungen: siehe Abbildungen, Peptidkonzentration = 0.5 mM. **30AN***: N-formyliertes Peptid **30AN** (analog Struktur **30QF**, Abbildung 44).

TCEP (0.3 M)/Morpholin (1.2 M) und Verringerung der Reaktionstemperatur (40°C→RT) konnte die Selektivität der Reaktion noch gesteigert werden (83%, Abbildung 46D). Anschließend wurde die Entfernung des 2MP-Auxiliars am Ala-Asn-verknüpften Ligationsprodukt **151AN** untersucht. Wie bereits am 2MPE- und 2ME-Auxiliar beobachtet, lieferte die Reaktion in Gegenwart von 0.3 M TCEP und 1.2 M Morpholin signifikante Mengen des N-formylierten Peptids **30AN*** (18%) (Abbildung 46C'). Analog zum 2MPE-Auxiliar konnte diese Nebenreaktion durch Verwendung einer hohen TCEP und Morpholin-Konzentration (1.0 M/ 4.0 M) deutlich verringert werden (18%→7%; Abbildung 46C'/D'). Weitaus problematischer zeigte sich jedoch die Spaltung der Ala-Asn-Amidbindung, welche je nach Reaktionsbedingungen die Selektivität der Reaktion um 30-35% reduzierte. Aufgrund dieser Nebenreaktionen wurde das Ala-Asn Modellpeptid **151AN** lediglich mit einer maximalen (analytische) Ausbeute von 50% erhalten.

Anhand der verfügbaren Daten scheint die unerwünschte Spaltung der im Zuge der Peptidligation aufgebauten Amid-Bindung durch die Reaktionsbedingungen (Temperatur und TCEP- bzw. Morpholin-Konzentration), der Struktur des verwendeten N^α-Auxiliars und vor allem durch die an der Ligationsstelle vorhandenen Aminosäuren bestimmt zu werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Amidbindungsspaltung bevorzugt an den Auxiliaren auftritt, welche Alkylthiol-Funktionen (2ME, 2MP) besitzen - sofern die Abspaltung nicht an einer Gly-Gly-Verknüpfungsstelle erfolgt. Zusätzlich scheint der sterische Anspruch der (primären bzw. sekundären) alkyliischen Thiolfunktion die Nebenreaktion kaum zu beeinflussen. Diese beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Spaltung des Ligationsproduktes möglicherweise

nicht über einen N→S-Acyltransfer, mit anschließender Hydrolyse der Thioesterpeptidspezies, verläuft. In diesem Fall müsste die Nebenreaktion aufgrund der geringeren Nukleophilie der alkylischen Thiole (im Vergleich zum benzyllischen Thiol des 2MPE-Auxiliars) und mit zunehmenden sterischen Anspruch eher erschwert werden. Es ist auch möglich, dass die Spaltung der Amid-Bindung über ein Intermediat der radikalischen Auxiliar-Abspaltung eingeleitet wird. Im Fall der β -ständigen CH_3 -Gruppe (2MP-Auxiliar) oder des H-Atoms (2ME-Auxiliar) könnte die vergleichsweise geringe Stabilität der Radikal-Intermediate dazu führen, dass die Amid-Spaltung als Nebenreaktion bevorzugt auftritt. Dies würde erklären, weshalb die Verwendung des Phenyl-Restes (2MPE-Auxiliar) zu einer deutlich erhöhten Selektivität führte.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass Ligationen an 2-Mercaptoethyl-basierten Auxiliaren schneller verlaufen, wenn das Grundgerüst mit einem β -ständigen Substituenten (Ph oder Me) ausgestattet ist. Der β -Substituent begünstigt vermutlich die Anordnung des Thioester-verknüpften Intermediates in Form eines reaktiven Rotamers, wodurch die Effizienz des S→N-Acyltransfers erhöht wird und dadurch die Verknüpfungsreaktion schneller erfolgen kann. Die Verwendung des 2MP- und des 2ME-Auxiliars ermöglichte Peptidligationen an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsstellen, wie bereits für das 2MPE-Grundgerüst beobachtet. Allerdings konnten die beiden Hilfsmoleküle nur selektiv von den jeweiligen Gly-Gly-verknüpften Ligationsprodukten **145GG/151GG** entfernt werden. An anderen Verknüpfungsstellen (Gln-Phe, Ala-Asn) wurde unter den Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung eine signifikante Spaltung der zuvor aufgebauten Amidbindung beobachtet. Demnach ist die Anwendung der beiden Auxiliare im Vergleich zum 2MPE-Auxiliar deutlich eingeschränkt. Aufgrund der einfachen Synthese von S-Trt-2-Mercaptoethanal **139** sollte jedoch die Verwendung des 2ME-Auxiliars für zukünftige Proteinsynthesen in Betracht gezogen werden, sofern das Zielprotein über eine geeignete Gly-Gly-Ligationsstelle verfügt.

4.3. Chemische Proteinsynthese ohne HPLC-Reinigung

Nach gegenwärtigem Stand werden bei der chemischen Proteinsynthese zahlreiche HPLC-basierte Reinigungsschritte benötigt, um das Zielprotein in hoher Reinheit zu erhalten. Im Fall einer konvergenten Synthese-Strategie werden üblicherweise zunächst die Peptidfragmente, welche im Zuge der Festphasenpeptidsynthese erhalten werden, mittels HPLC aufgereinigt. Nachdem die gereinigten Peptidfragmente miteinander verknüpft wurden, erfolgt eine weitere HPLC-Reinigung, um die Ligationsprodukte in reiner Form zu erhalten. Werden N^α-Auxiliare oder die Ligations-Entschwefelungsmethode (Kapitel 2.2.2) für die Peptidligation verwendet, müssen die jeweiligen Ligations-vermittelten Funktionalitäten anschließend entfernt werden. Je nach Methode können dabei weitere HPLC-basierte Reinigungsschritte erforderlich werden. Die hohe Anzahl an HPLC-Reinigungen ermöglicht die Synthese von Proteinen in hoher Reinheit. Allerdings wird durch jeden Reinigungsschritt die Gesamtausbeute an Zielprotein reduziert und gleichzeitig der Zeit- und Kostenaufwand der Synthese erhöht. Zusätzlich wird die vollständige Automatisierbarkeit der chemischen Proteinsynthese durch die Anwendung von HPLC-Reinigungen verhindert, da notwendige intermediäre Arbeitsschritte (Analyse und Vereinigung von Fraktionen, Gefriertrocknung, Probenvorbereitung) nur von qualifizierten Personal durchgeführt werden können.

Aufgrund dieser Nachteile sollte eine Methode entwickelt werden, welche die chemische Synthese von Proteinen ohne eine einzige HPLC-Reinigung ermöglicht. Nach dem Vorbild der rekombinanten Proteinsynthese sollte die Reinigung der Proteine durch Affinitätschromatographie erfolgen, um die Notwendigkeit einer HPLC-Reinigung zu umgehen. Das Konzept der „HPLC-freien“ Proteinsynthese ist in Abbildung 47 dargestellt: Dabei wird das reine Protein **160** durch Einsatz von zwei orthogonalen Affinitäts- bzw. Reaktivitätsmarkierungen und der 2MPE-Auxiliar-vermittelten Peptidligation auf der Festphase erhalten. Der benötigte Peptidthioester **152** wird mittels Fmoc-basierter SPPS aufgebaut und im letzten Schritt der Synthese eine Hexahistidin-Einheit (His₆) eingeführt. Diese N-terminale Affinitätsmarkierung ermöglicht, die selektive Immobilisierung des Volllängenpeptids auf Ni-NTA-Agarose. Verunreinigungen des Rohproduktes, wie die N-acetylierten Abbruchsequenz **153**, werden durch einfaches Waschen des Ni-NTA-Agaroseharzes entfernt, wodurch der gereinigte und Harz-gebundene Peptidthioester **154** erhalten wird. Parallel dazu erfolgt die Synthese des benötigten Auxiliar-Peptids **155** als C-

terminales Peptidhydrazid, welches ebenfalls mittels Fmoc-SPPS aufgebaut wird. Durch Einführung des Auxiliars im letzten Schritt der SPPS reagiert ausschließlich das Auxiliar-tragenden Volllängenpeptid **155** in der nachfolgenden Peptidligation auf der Festphase mit dem gereinigten, Harz-gebundenen Peptidthioester **154**. Aus diesem Grund kann das Rohprodukt des C-terminalen Fragments **155** direkt eingesetzt werden. Die Verunreinigungen des Rohproduktes werden im Zuge der Peptidligation, oder spätestens im nachfolgenden Waschschritt, auf einfache Weise entfernt. In eigenen Vorarbeiten wurde festgestellt, dass die Peptidligation auf der Festphase weniger effizient als in Lösung erfolgt. Dadurch wird in diesem Schritt stets das Hydrolyseprodukt **158** des Peptidthioesters gebildet, welches das finale Produkt verunreinigen würde. Um eine Abtrennung dieses Nebenproduktes zu ermöglichen, wird das Auxiliar-Peptid **155** als C-terminales Peptidhydrazid eingesetzt. Damit verfügt das Ligationsprodukt **157** über eine zweite, orthogonale Reaktivitätsmarkierung, welche eine Abtrennung des Hydrolyseproduktes **158** im späteren Verlauf der Methode ermöglicht. Zunächst wird jedoch das 2MPE-Auxiliar vom Harz-gebundenen Ligationsprodukte **157** entfernt. Im Anschluss wird das native Protein vom Ni-NTA-Agaroseharz eluiert und

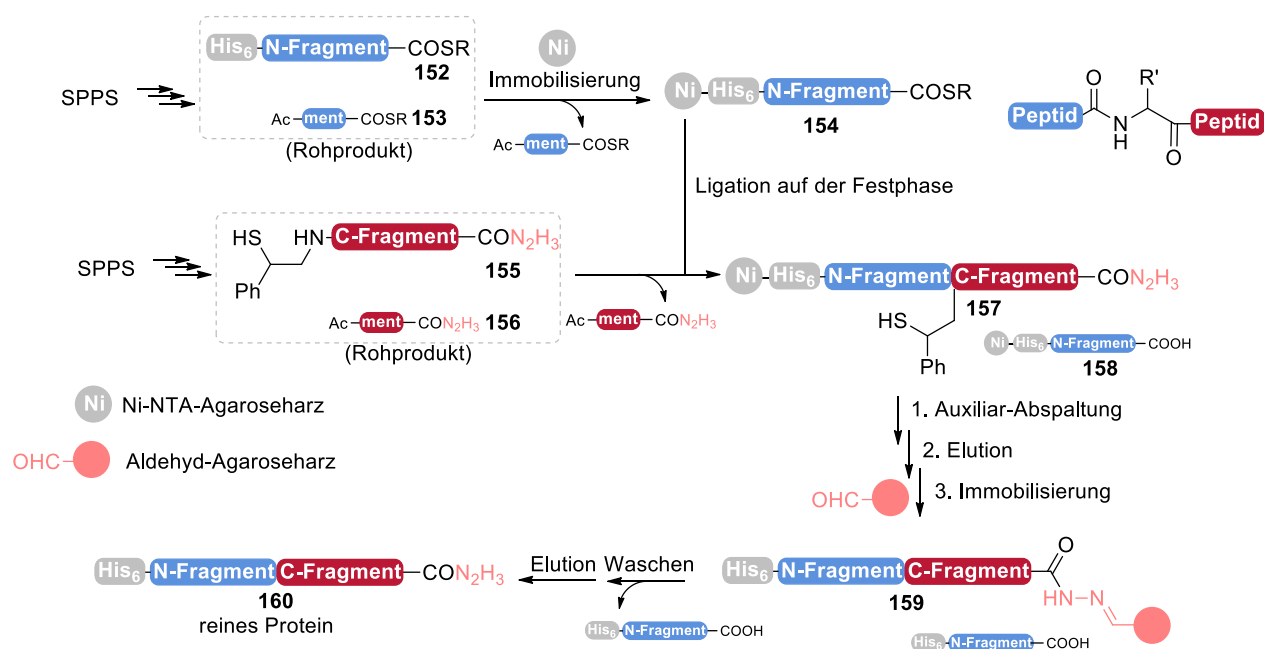


Abbildung 47: Konzept der HPLC-freien Proteinsynthese: Die Immobilisierung des His_6 -Peptidthioesters **152** auf Ni-NTA-Agarose führt zur Abtrennung der Verunreinigung **153** aus dem Rohprodukt der SPPS. Die anschließende Auxiliar-vermittelte Peptidligation erfolgt auf der Festphase und führt zur Bildung des gewünschten Ligationsproduktes **157** unter gleichzeitiger Entfernung der Abbruchsequenz **156** aus dem Rohprodukt des Auxiliar-Peptids **155**. Durch Abspaltung des Auxiliars, Elution und selektiver Immobilisierung des Zielproteins (in **159**) können verbleibende Verunreinigungen, wie beispielsweise der hydrolysierte Peptidthioester **158**, durch einfache Waschschritte entfernt werden. Die Spaltung der Hydrazon-Bindung führt zur Freisetzung des gereinigten Proteins **160**.

durch nachfolgende, selektive Immobilisierung auf Aldehyd-funktionalisierten Agarose-kügelchen von dem während der NCL-Reaktion anfallenden Hydrolyse-produkt **157** befreit. Die finale Spaltung der Hydrazon-Bindung des immobilisierten Peptidhydrazons **159** führt zur Freisetzung des Zielproteins **160** in hoher Reinheit – ohne dass es einer einzigen HPLC-Reinigung bedarf. Die Immobilisierung von Peptidhydraziden auf Aldehyd-funktionalisierten Harzen und deren anschließende Freisetzung wurde in Arbeiten von Dr. Robert Zitterbart im Vorfeld des Forschungsvorhabens etabliert.^[104]

Um die Anwendbarkeit und das Potential der HPLC-freien Proteinsynthese zu demonstrieren, wurde die Synthese von unterschiedlich langen Mucin-1-Proteinen (Abkürzung: MUC1) als Ziel gesetzt. Die extrazelluläre Domäne der MUC1-Proteine ist aus 20-125 Wiederholungseinheiten aufgebaut. Diese sogenannten VNTR-Wiederholungseinheiten (VNTR: „variable number of tandem repeats“) bestehen aus einer 20 Aminosäuren langen Sequenz.^[105] Da die Sequenz (PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA) der VNTR-Wiederholungseinheiten keinen Cystein-Rest besitzt, scheidet die Anwendung der NCL zur Synthese von langen MUC1-Protein aus. In Arbeiten von Aucagne *et al.* wurde dieses Problem durch den Einsatz der kupferkatalysierten Alkin-Azid-Cycloaddition umgangen. Dabei konnten 160 Aminosäuren lange MUC1-Proteine erhalten werden, welche jedoch über drei Triazol-Einheiten im Peptidrückgrat verknüpft wurden.^[106] Im Gegensatz dazu bietet die His-Gly-Verknüpfungsstelle eine geeignete Position, um die Synthese unmodifizierter, nativer MUC1-Proteine durch Anwendung der Auxiliar-vermittelten Peptidligation zu ermöglichen. Im Rahmen des Forschungsvorhabens sollten fünf MUC1-Proteine (**163a-e**) mit einer Länge von 46-126 Aminosäuren, entsprechend zwei bis sechs Wiederholungseinheiten sowie der His₆-Affinitätsmarkierung, dargestellt werden (Abbildung 48). Dabei würden die gewünschten Zielproteine durch kombinatorische Verknüpfung von unterschiedlich langen Peptidthioestern (**161a-c**) und Auxiliarpeptiden (**162a-c**), bestehend aus je ein bis drei Wiederholungseinheiten, erhalten werden. Die drei benötigten His₆-markierten Peptid-thioester **161a-c**, mit einer Länge von 26 (**161a**), 46 (**161b**) bzw. 66 (**161c**) Aminosäuren, wurden an einem Chlorotriyl-Harz durch Anwendung der Fmoc-SPPS aufgebaut. Anschließend wurden die erhaltenen Proteinfragmente als vollständig geschützte Peptidsäuren vom Harz abgespalten und durch Reaktion mit 3-Mercaptopropionsäuremethylester bei -35°C in Gegenwart von

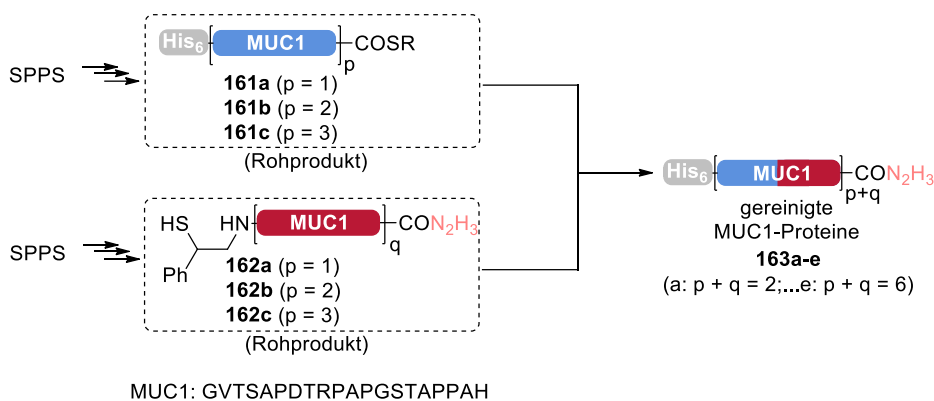


Abbildung 48: Anwendung der HPLC-freien Proteinsynthese am Beispiel unterschiedlich langer MUC1-Proteine: Die nach der SPPS erhaltenen His₆-markierten MUC1-Peptidthioester **161a-c** und 2MPE-Auxiliar-tragenden MUC1-Peptidhydrazide **162a-c** werden als Rohprodukte in der HPLC-freien Proteinsynthese eingesetzt. Dabei werden die fünf MUC-1 Proteine **163a-e** mit einer Länge von 46-126 Aminosäuren erhalten.

PyBOP/DIPEA in die entsprechenden Peptidthioester überführt (siehe Kapitel 6.15.1.).^[94] Untersuchungen an kürzeren sequenzanalogen Peptidfragmenten bestätigten, dass unter diesen Bedingungen die Überführung der Peptidsäure in den Peptidthioester ohne Racemisierung des C-terminalen Histidin-Restes erfolgt (siehe Kapitel 6.15.2.). Anschließend wurden die Schutzgruppen durch TFA-Behandlung entfernt, die Peptidthioester **161a-c** in Ether gefällt und gefriergetrocknet. Die erhaltenen Rohprodukte wurden in wässrigem Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) gelöst (Peptidkonzentration ~ 2 mM) und auf wasserquellbare Ni-NTA-Agarosekügelchen gegeben (Abbildung 49A). Durch UPLC-Analyse konnte gezeigt werden, dass die His₆-markierten Peptidthioester in weniger als 15 Minuten vollständig aus der wässrigen Lösung extrahiert wurden und demnach die Immobilisierung auf den Ni-NTA-Agarosekügelchen erfolgte. Im nächsten Schritt wurden Verunreinigungen der Rohprodukte, wie 3-Mercaptopropionsäuremethylester und N-acetylierte Abbruchsequenzen, durch fünffaches Waschen des Ni-NTA-Agaroseharzes mit Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) entfernt und auf diesem Weg die drei gewünschten Harzgebundenen Peptidthioester **161a-c** in hoher Reinheit erhalten (siehe Abbildung 49C und Kapitel 6.15.3.). Zum Nachweis wurde eine geringe Menge der Peptidthioester-tragenden Ni-NTA-Agarosekügelchen mit 0.1% TFA behandelt (Spaltung des His₆-Ni-Komplexes) und die erhaltene Lösung analysiert (siehe Abbildung 49C).

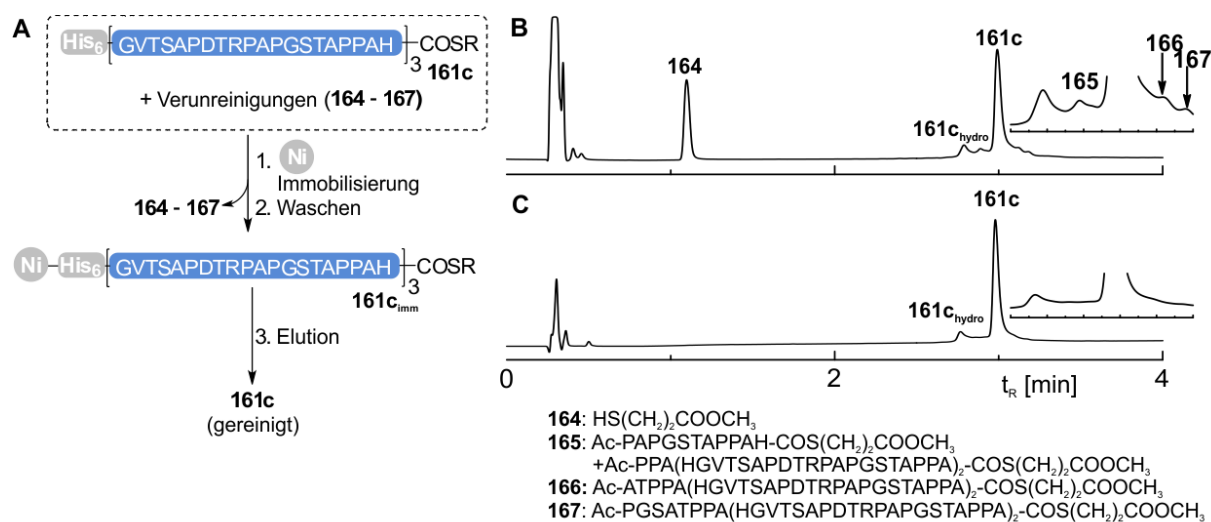


Abbildung 49: Reinigung des 66 Aminosäuren langen His₆-MUC1-Peptidthioesters **161c** durch Affinitätschromatographie (A): Der Volllängenpeptidthioester **161c** wird auf dem Ni-NTA-Agaroseharz selektiv immobilisiert (**161c_{imm}**) und die Verunreinigungen **164-167** durch Waschen des Harzes entfernt. Anschließend wird der His₆-MUC1-Peptidthioesters **161c** vom Harz freigesetzt und dabei in reiner Form erhalten. UPLC-Analysen vor (B) und nach (C) der Affinitätschromatographie-basierten Reinigung. Immobilisierung: Rohprodukt in wässrigen Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5); Waschen: 5 x 200 µL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5); Elution: wässrige 0.1% TFA.

Die Synthese der drei benötigten Auxiliär-Peptidhydrazide **162a-c** erfolgte an einem vorbeladenen Fmoc-His(Trt)-Hydrazin-Chlorotrityl-Harz.^[107] Im Anschluss an die Fmoc-SPPS wurde das 2MPE-Auxiliär durch reduktive Aminierung eingeführt. Die nachfolgende TFA-Behandlung, Ether-Fällung und Gefriertrocknung lieferte die drei gewünschten Rohprodukte der 20-60 Aminosäuren langen Auxiliärpeptide **162a-c** (siehe Kapitel 6.15.4.). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass im Zuge der TFA-Behandlung stets Trifluoroacetylierung der C-terminalen Peptidhydrazid-Einheit beobachtet wurde. Diese Nebenreaktion konnte erst durch relative hohe Anteile an Wasser (>8%) in der TFA-Lösung ausreichend reduziert werden (siehe Kapitel 6.15.5.).

Nachdem die sechs Proteinfragmente als Rohprodukte (Auxiliärpeptide **162a-c**) bzw. als bereits gereinigte, Harz-gebunden, Peptidthioester **161a-c_{imm}** erhalten wurden, sollten diese in einem kombinatorischen Verfahren miteinander verknüpft werden. Wie bereits angemerkt, musste in eigenen Vorarbeiten und Arbeiten von Dr. Ziv Harpaz^[52] bereits festgestellt werden, dass Peptidligationen auf der Festphase langsamer als in Lösung verlaufen. Aus diesem Grund wurde die heterogene Verknüpfungsreaktion zunächst optimiert. Dazu wurde die Synthese des 86 Aminosäuren langen MUC-1 Proteins **163c** durch Verknüpfung des gereinigten Harz-gebundenen Peptidthioesters **161b_{imm}** mit dem Rohprodukt des Auxiliärpeptids **162b** untersucht (Abbildung 50). In ersten Experimenten erfolgte die

Peptidligation auf der Festphase mit einem Überschuss des C-terminalen Fragments **162b** (2.5 Äq.) bei pH 7 und in Gegenwart von Thiophenol als NCL-Katalysator. Nach 24 h wurde die Ligationslösung entfernt, das Ni-NTA-Agaroseharz gewaschen und die SPCL-Reaktion analysiert. Zur Freisetzung der Harz-gebundenen Peptide wurde eine geringe Menge des Trägermaterials für 10 Minuten mit wässriger 0.1 M Imidazol-Lösung (pH 8.5) behandelt. Die UPLC-Analyse der erhaltenen Lösung ergab, dass die festphasenbasierten ENCL-Reaktion nur eine Ausbeute von 68% lieferte (Abbildung 50C), obwohl das Auxiliarpeptid bereits im Überschuss (2.5 Äq.) eingesetzt wurde. Es wurde vermutet, dass die relativ geringe Ausbeute auf einen ineffizienten Transport des Auxiliarpeptids in die Poren des polymeren Trägermaterials und/oder auf unspezifische Bindung der Reaktanden an den Ni-NTA-Agaroseharz zurückzuführen ist. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes (7.0→7.5) konnte die Ausbeute auf 77% gesteigert werden (Tabelle, Abbildung 50E). Anschließend wurde Thiophenol durch das wasserlösliche Thioladditiv MPAA (50 mM) ersetzt und dabei eine Ausbeute von 89% erhalten. Allerdings konnte dieser effiziente NCL-Katalysator nach der Verknüpfungsreaktion, selbst durch intensives Waschen, nicht vollständig aus dem

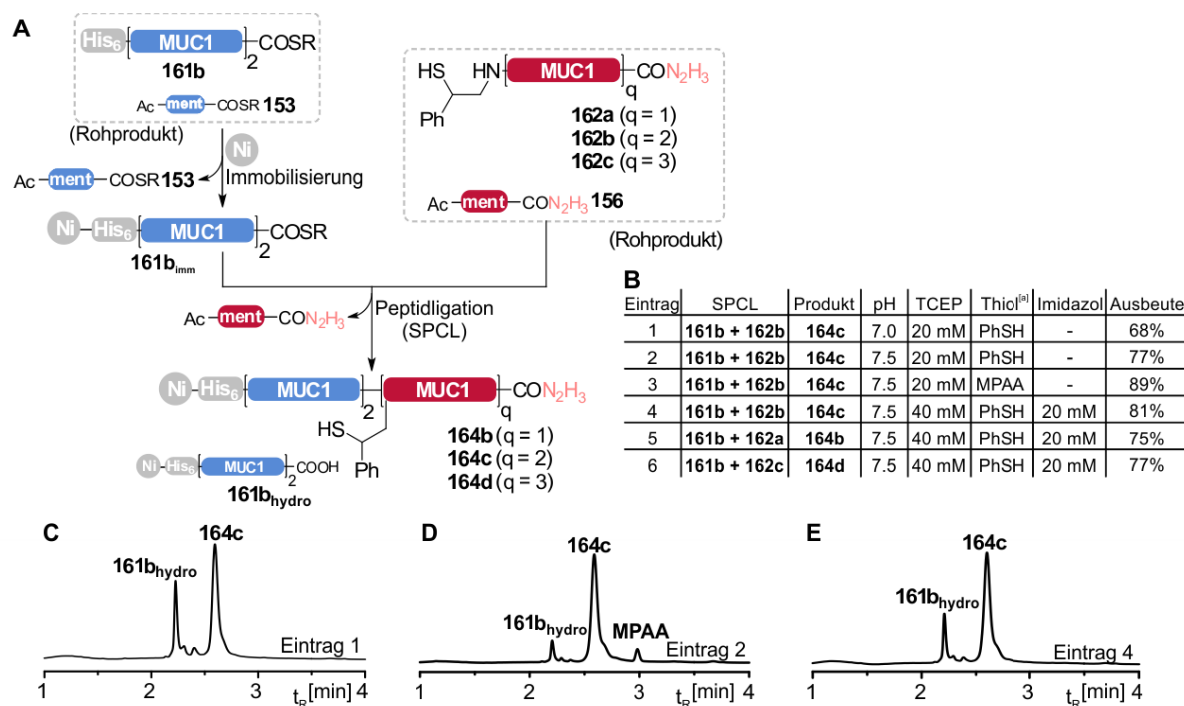


Abbildung 50: Reinigung des 46 Aminosäuren langen His₆-MUC1-Peptidthioesters **161b** durch Affinitätschromatographie und anschließende Peptidligation auf der Festphase mit den Rohprodukten der Auxiliarpeptide **162a-c** (A): Tabellarische Übersicht der untersuchten SPCL-Reaktionen und den ermittelten Ausbeuten (B). UPLC-Analysen der Eluate, welche im Anschluss an die SPCL durch Behandlung der Ligationsprodukt-tragenden Ni-NTA-Agaroseharze mit 0.1 M wässriger Imidazol-Lösung (pH 8.5) erhalten wurden (C-E). Immobilisierung: Rohprodukt von **161b** in wässrigem Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5); Ligation: Rohprodukt von **162a-c** in wässrigem Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄), Bedingungen wie in Tabelle (B) angegeben; [a]: 2 Vol.-% PhSH, 50 mM MPAA.

polymeren Trägermaterial entfernt werden (Abbildung 50D). Da in Arbeiten von *Brik et al.* gezeigt wurde, dass radikalische Entschwefelungsreaktionen durch MPAA gestört werden^[37b] und die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars über diesen Reaktionstyp initiiert wird, wurde die Verwendung von MPAA nicht weiter verfolgt. Unabhängig vom eingesetzten Thiol-Additiv konnten nach der Verknüpfungsreaktion stets Disulfid-Peptidspezies des Auxiliarpeptids im Ligationspuffer nachgewiesen werden. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurde die TCEP-Konzentration auf 40 mM erhöht. Da in separaten Experimenten gezeigt werden konnte, dass die Ausbeute der SPCL-Reaktion durch Zugabe von Imidazol gesteigert wird (siehe Kapitel 6.15.6.), wurde dem Ligationspuffer Imidazol (20 mM) zugesetzt. Es wurde vermutet, dass Imidazol unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Peptidfragmenten und dem Ni-NTA-Agaroseharz reduziert, welche die Verknüpfungsreaktion beeinträchtigen. Durch Verwendung eines Ligationspuffers mit 40 mM TCEP und 20 mM Imidazol wurde die Ausbeute der Festphasen-basierten Peptidligation von 77% auf 81% erhöht (Abbildung 50E). Anschließend wurden die optimierten Bedingungen in zwei weiteren SPCL-Reaktionen getestet. Die Verknüpfungsreaktion des Harz-gebundene Peptidthioester **161b_{imm}** mit den 20- und 60 Aminosäuren langen Auxiliarpeptiden **162a** und **162c** lieferten in beiden Fällen eine Ausbeute $\geq 75\%$ (Tabelle, Abbildung 50E). Da verbleibende oder hydrolysierte Peptidthioester im späteren Verlauf der HPLC-freien Proteinsynthese durch Verwendung der zweiten orthogonalen Reaktivitätsmarkierung abgetrennt werden können, ist ein quantitativer Umsatz der SPCL-Reaktion nicht notwendig. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Ausbeuten als für das Forschungsvorhaben ausreichend eingestuft und im nächsten Schritt die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars auf der Festphase untersucht (Abbildung 51). Dazu wurde das Ligationsprodukt-tragende Ni-NTA-Agaroseharz **164c** mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) behandelt. Da sowohl das Ligationsprodukt **164c** als auch das native Peptid **163c** über eine His₆- Affinitätsmarkierung und eine Hydrazid-Einheit verfügen, muss in diesem Schritt ein vollständiger Umsatz des Auxiliar-tragenden Ligationsproduktes in das native Peptid erfolgen. Um einen quantitativen Reaktionsumsatz zu gewährleisten wurde die Auxiliar-Abspaltung bei erhöhter Temperatur (40°C) und für 24 h durchgeführt. Allerdings wurde unter diesen Bedingungen die partielle Ablösung des nativen Peptids **163c** vom polymeren Träger in die Auxiliar-Abspaltungslösung beobachtet. Da Trialkylphosphine und sekundäre Amine potentielle δ -Donor-Liganden sind, wurde vermutet, dass die His₆-markierten Peptide bei hoher TCEP/Morpholin-Konzentration aus

dem Ni-Komplex verdrängt werden. Dieses Problem konnte gelöst werden, indem die Auxiliar-Abspaltungslösung durch Zugabe von 1M HCl auf pH 7 eingestellt wurde. Unter diesen Bedingungen liegen TCEP und Morpholin größtenteils protoniert vor, womit deren Eigenschaft, als konkurrierende δ -Donor Liganden zu agieren, verloren geht. Im Gegensatz dazu besitzen die His₆-markierten MUC1-Proteine bei pH 7 noch eine ausreichende Affinität zu dem Ni-NTA-Harz und werden aus diesem Grund reimmobilisiert. Im nächsten Schritt wurde das Ni-NTA-Harz mit 0.25 M Essigsäure (pH 3.6) behandelt und dabei das native MUC1-Protein **163c**, zusammen mit dem hydrolysierten Peptidthioester **161b_{hydro}**, freigesetzt (Abbildung 51B). In der erhaltenen Lösung konnten geringe Mengen des Morpholin-Adduktes **161b_{Morph}** nachgewiesen werden, welches vermutlich im Zuge der Auxiliar-Abspaltung durch Aminolyse von verbleibenden Peptidthioester **161b_{imm}** gebildet wird. Anschließend wurde die essigsaurige Lösung des Rohproduktes auf ein Aldehyd-funktionalisiertes Agaroseharz aufgetragen. Durch Ausbildung der Hydrazon-Bindung erfolgte unter diesen Bedingungen die selektive Immobilisierung des nativen MUC1-Proteins

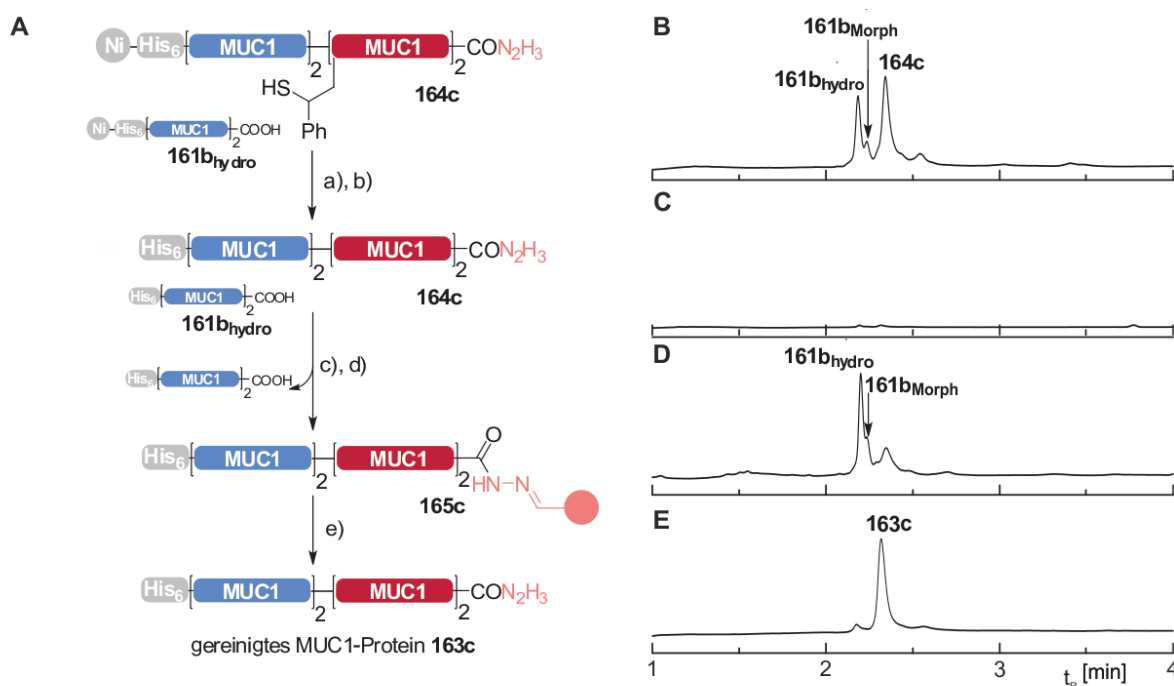


Abbildung 51: HPLC-freie Reinigung des 86 Aminosäuren langen MUC1-Proteins **163c** (A). UPLC-Analysen des Rohproduktes vor (B) und nach (C) der Immobilisierung auf dem Aldehyd-funktionalisierten Agaroseharz, der Waschlösung (D) und des gereinigten MUC-1 Proteins **163c** (E). Bedingungen: a) 0.2 M TCEP, 0.8 M Morpholin, pH 8.5, 40°C; b) Elution: 0.25 M AcOH, pH 3.6, RT; c) Immobilisierung: 0.25 M AcOH, pH 3.6, Aldehyd-funktionalisiertes Agarose-Harz, RT; d) Waschen: 10 x wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5), 5 x Wasser; e) 0.5 Vol.-% N₂H₄ in Wasser, RT; **161b_{Morph}**: Aminolyseprodukt von **161b** und Morpholin.

163c. Überraschenderweise wurde in diesem Schritt auch der hydrolysierte Peptidthioester aus der Lösung durch unspezifische Bindung extrahiert (Abbildung 51C). Nach 30 Minuten wurde das Harz mit einem wässrigen Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5) und Wasser gewaschen und auf diesem Weg die unspezifisch gebundenen Proteinfragmente **161b_{hydro}** und **161b_{Morph}** aus dem polymeren Träger entfernt (Abbildung 51D). Anschließend wurde das gereinigte MUC-1-Protein **163c** nach einer Methode von Dr. Robert Zitterbart freigesetzt.^[104] Zur notwendigen Spaltung der Hydrazon-Bindung wurde das Aldehydfunktionalisierte Agarose-Harz mit einer wässrigen Hydrazin-Lösung (0.5 Vol.-%) behandelt. Dabei wurde das gewünschte MUC1-Protein **163c** mit hoher Reinheit (>90%) erhalten (Abbildung 51E). Zur gravimetrischen Bestimmung der Ausbeute wurde die wässrige Lösung des finalen MUC1-Proteins **163c** mit 0.1% TFA behandelt und anschließend gefriergetrocknet. Die Zugabe von TFA verhindert, dass Hydrazin im Zuge der Gefriertrocknung aufkonzentriert wird, da in diesem Fall Nebenreaktionen wie die unerwünschte Spaltung von Peptidbindungen auftreten können.^[108] Auf diesem Weg wurde das finale MUC1-Protein **163c** mit einer Ausbeute von 21%, als TFA-Salz, erhalten. Die Ausbeute wurde auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes berechnet und beinhaltet damit die Festphasenpeptidsynthese und alle folgenden Teilschritten der HPLC-freien Proteinsynthese (Immobilisierung, Ligation, Abspaltung, etc.).

Anschließend wurde das entwickelte Protokoll für die HPLC-freie Synthese von acht weiteren MUC1-Proteinen **163a-e** angewendet. Dazu wurden die Rohprodukte der drei Peptidthioester **161a-c** und der drei Auxiliärpeptide **162a-c** parallel in acht unterschiedlichen SPCL-Reaktionen umgesetzt (Abbildung 52A). Die UPLC-Analyse der finalen Produkte bestätigte die erfolgreiche Synthese der gewünschten MUC1-Proteine **163a-e** mit einer Länge von 46 (**163a**) bis hin zu 126 (**163e**) Aminosäuren (Abbildung 52B-E und Tabelle, siehe auch Kapitel 6.15.8.). In allen Fällen lieferte die HPLC-freie Proteinsynthese die gewünschten Zielproteine in hoher Reinheit (90-98%). Je nach Verknüpfungsreaktion wurden die gewünschten MUC1-Proteine mit einer Ausbeute von 7-33% ermöglicht (siehe Kapitel 6.15.8.). Wie bereits erwähnt, ist die Ausbeute auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes bezogen und berücksichtigt somit den gesamten Prozess der SPPS und HPLC-freien Proteinsynthese. Demnach erscheint die Leistungsfähigkeit der entwickelten Methode mit der von konventionellen chemischen

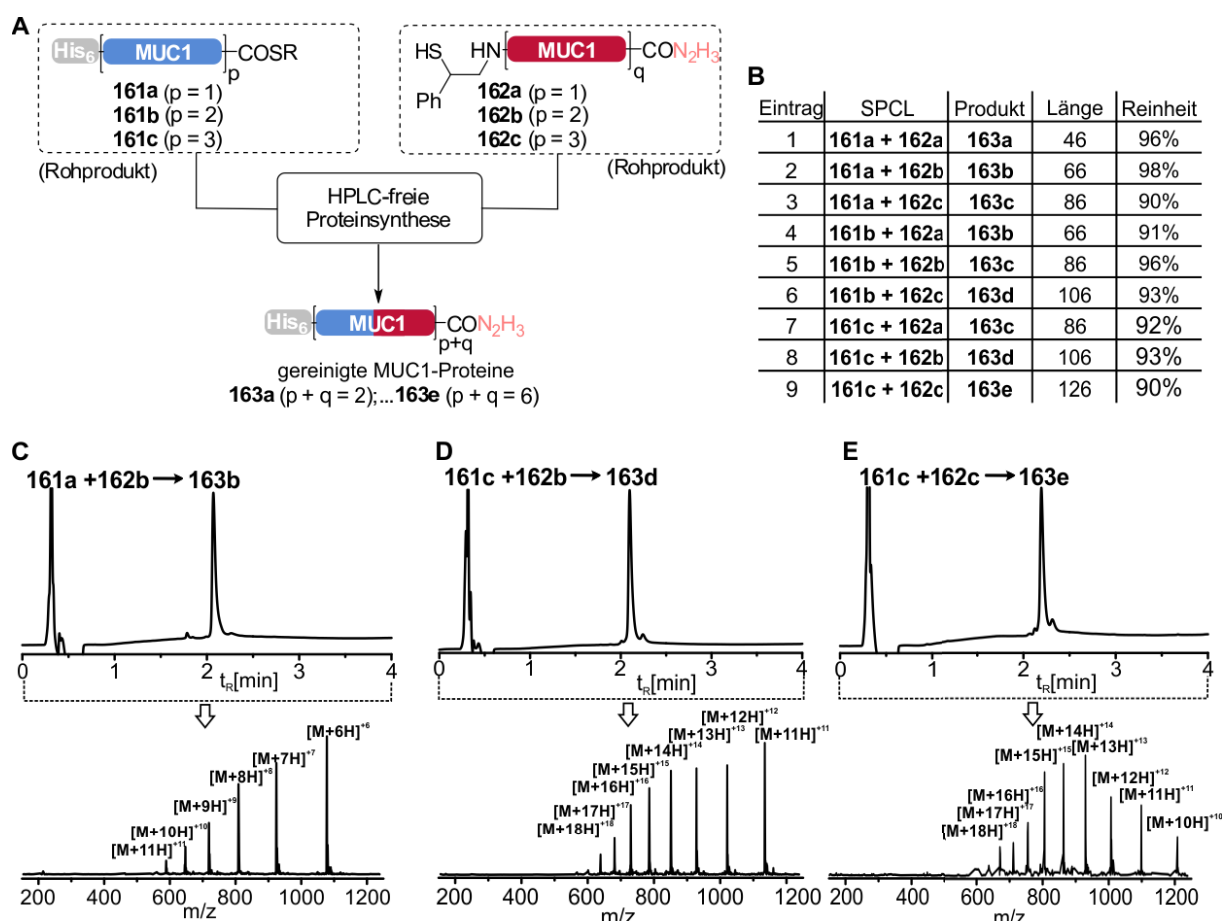


Abbildung 52: HPLC-freie Proteinsynthese der MUC1-Proteine **163a-e** (A). Tabellarische Übersicht der durchgeführten Verknüpfungsreaktionen unter Angabe der Länge (Anzahl Aminosäuren) und Reinheit der finalen Zielproteine **163a-e** (B). UPLC- und MS-Analysen ausgewählter MUC-1-Proteine, welche durch Anwendung der HPLC-freien Proteinsynthese erhalten wurden (C-E). Die Massenspektren repräsentieren den gesamten Bereich der abgebildeten Chromatogramme.

Proteinsynthesen (Ligation in Lösung, HPLC-Reinigung, etc.) vergleichbar. Ausgehend von den Rohprodukten der SPPS konnten die gereinigten MUC1-Proteine **163a-e** in weniger als drei Tagen erhalten werden. Im Vergleich dazu würde die Synthese dieser kleinen „Proteinbibliothek“ mit Hilfe von HPLC-basierten Reinigungsschritten vermutlich ein bis zwei Wochen in Anspruch nehmen. Der reduzierte Zeitbedarf ist größtenteils auf die Vermeidung von intermediären Gefriertrocknungsschritten und Analyseprozessen zurückzuführen. Zusätzlich wurde der Zeitaufwand weiter verringert indem die HPLC-freie Synthese in einem parallelen Format durchgeführt wurde. Die Parallelisierbarkeit der Methode müsste vor allem einen erheblichen (zeitlichen) Vorteil ermöglichen, wenn eine große Anzahl von Zielproteinen dargestellt werden soll. Zusätzlich ist anzumerken, dass die HPLC-freie Synthese der neun MUC1-Proteine weniger als 100 mL wässriger Waschlösungen verbrauchte. Im Vergleich dazu würde eine HPLC-basierte Synthese ungefähr die 60-fache Menge an wässrigen-organischen Abfällen produzieren. Ein weiterer Vorteil der

Methode ist, dass durch die Verwendung der chemoselektiven Reaktivitätsmarkierungen auch Verunreinigungen abgetrennt werden können, welche durch HPLC-basierten Reinigungsmethoden nicht (oder nur schwer) entfernt werden können (siehe Kapitel 6.15.9.).

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel eine neue Methode vorgestellt werden, welche die chemische Synthese von Proteinen ermöglicht, ohne HPLC-Reinigungsschritte anwenden zu müssen. Im Vergleich zur konventionellen HPLC-basierten Proteinsynthese, erlaubt die Methode einen schnelleren Zugang zu den gewünschten Zielproteinen. Zusätzlich werden für die Reinigungs- und Waschschrte deutlich weniger Lösungsmittel benötigt und dadurch die Produktion von giftigen wässrigen-organischen Abfällen reduziert. Durch die Verwendung zweier orthogonaler Reaktivitätsmarkierungen können die im Zuge der Fmoc-SPPS erhaltenen C- und N-terminalen Proteinfragmente als Rohprodukte direkt eingesetzt werden. Die Verknüpfung der Proteinfragmente wird durch das 2MPE-Auxiliar vermittelt und erfolgt auf der Festphase. Ein wesentlicher Vorteil der Methode ist, dass ein quantitativer Umsatz der SPCL-Reaktion nicht notwendig ist, um am Ende das gewünschte Protein in reiner Form zu erhalten. Demnach können die Proteinfragmente, wie sie als Rohprodukte nach der SPPS erhalten werden, direkt und ohne Kenntniss der Stöchiometrie eingesetzt werden. Dies sollte die Anwendbarkeit der Methode im Rahmen eines automatisierten Prozesses erleichtern. Die Zugabe und Abtrennung der für die HPLC-freie Proteinsynthese benötigten Reagenzien, Waschlösungen und funktionellen Harze könnte in Zukunft von Syntheseautomaten übernommen werden. Demnach könnte die Kombination von automatisierter SPPS und dem HPLC-freien Syntheseprotokoll der Weg zu einem vollständig programmierbaren Verfahren der chemischen Protein- oder Proteinbibliotheksynthese eröffnen.

4.4. Synthese und Anwendung des 2-Selenol-2-phenyl-ethyl-Auxiliars

Mit dem 2-Mercapto-2-phenyl-ethyl-Grundgerüst konnte erstmals ein Auxiliartyp vorgestellt werden, welcher Peptidligationen an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsstellen ermöglicht und zusätzlich unter mild-basischen Bedingungen selektiv entfernt wird. Wie bereits erläutert, verlaufen die 2MPE-Auxiliar-vermittelten Verknüpfungsreaktionen im Vergleich zur NCL oder der Ligations-Entschwefelungsstrategie eher langsam (Kapitel 4.2.6). Dies ist vermutlich auf das an der Ligation beteiligte sekundäre Amin zurückzuführen, welches den S→N-Acyltransfers im Vergleich zu einem primären Amin (NCL, Ligations-Entschwefelungsstrategie) erschwert. Das sekundäre Amin ist jedoch ein essentieller Bestandteil der N^α-Auxiliar-vermittelten Peptidligation, da dieses die kovalente Anbindung des Grundgerüsts an der N-terminalen Aminofunktion ermöglicht. Im Fall des 2MPE-Auxiliars wurde der sterische Anspruch des sekundärenamins durch die benachbarte CH₂-Gruppe bereits möglichst gering gehalten und damit ein besonders effizienter S→N-Acyltransfer ermöglicht. Demnach kann eine weitere Verbesserung dieser ENCL-Methode am einfachsten erfolgen, indem der „erste“ Teilschritt der Verknüpfungsreaktion, die Thiol-Austauschreaktion, optimiert wird.

Aus diesem Grund sollte im letzten Teil der vorliegenden Arbeit ein N^α-Auxiliar entwickelt werden, welches die ENCL-Reaktionen über eine Selenol-Funktion vermittelt. Diese Klasse von N^α-Auxiliaren wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Aufgrund der hohen Nukleophilie von Alkylselenolen (siehe Abschnitt 2.2.2) wurde angenommen, dass Selenolfunktionalisierte N^α-Auxiliare deutlich schnellere Verknüpfungsreaktionen erlauben würden als deren Thiol-Analoga. Da mit dem 2MPE-Grundgerüst bereits eine Leitstruktur etabliert wurde, welche besonders schnelle Auxiliar-vermittelte Peptidligationen ermöglicht, sollte dessen Selenol-Analogon, das 2-Selenol-2-phenyl-ethyl-Auxiliar (Abkürzung: 2SPE-Auxiliar, Struktur **1h** in Abbildung 53A) untersucht werden. Im ersten Schritt der Peptidligation (Abbildung 53B) erfolgt eine Thiol-Selenol-Austauschreaktion zwischen dem 2SPE-Auxiliarpeptid und dem Peptidthioester. Das dabei erhaltene Selenoester-verknüpfte Intermediat **50c** wird durch den nachfolgenden Se→N-Acyltransfer in das Ligationsprodukt **52c** überführt. Anschließend wird das 2SPE-Auxiliar entfernt und dabei das native Peptid **7** erhalten. Es wurde angenommen, dass die Abspaltung des 2SPE-Auxiliars durch eine

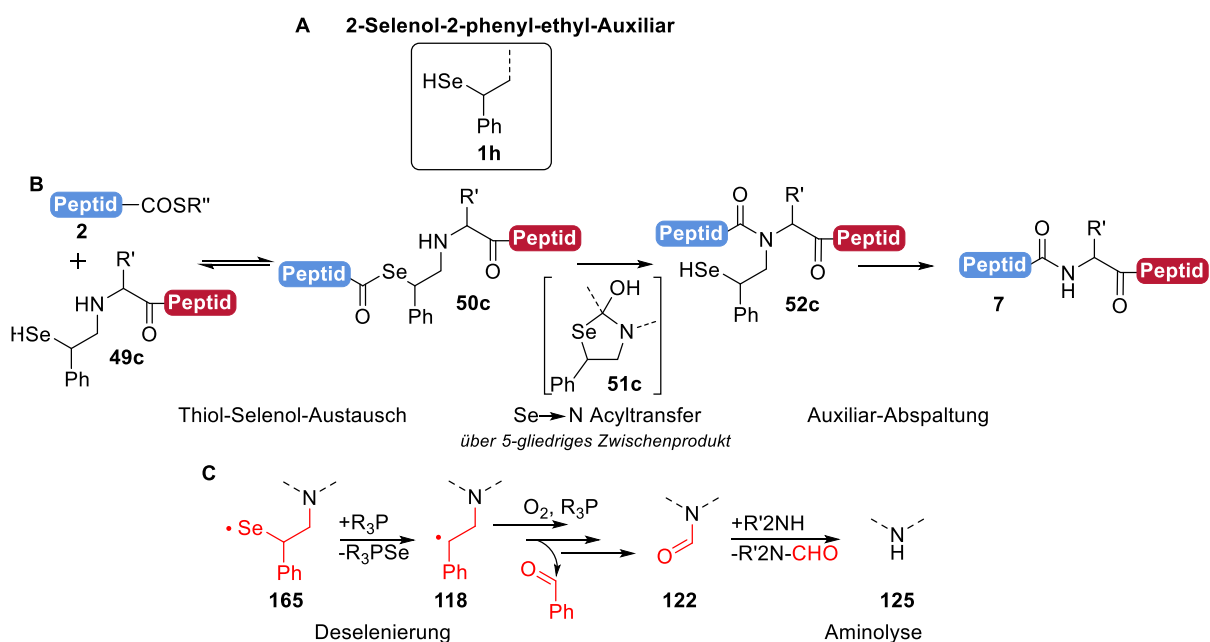


Abbildung 53: Chemische Struktur (A) und Anwendung (B-C) des 2-Selenol-2-phenyl-ethyl-Auxiliars **1h** in der ENCL: Die Peptidfragmente werden durch eine Thiol-Selenol-Austauschreaktion in räumliche Nähe gebracht. Anschließend erfolgt der Se→N-Acyltransfer über einen 5-gliedrigen Übergangszustand, wodurch das Zwischenprodukt **51c** und schließlich das Amid-verknüpfte Ligationsprodukt **52c** erhalten wird. Die Abspaltung des 2SPE-Auxiliars wird durch eine radikalische Deselenierung initiiert. Das erhaltene Benzylradikal-Intermediat **118** wird in Gegenwart von Sauerstoff, Trialkylphosphinen und sekundären Aminen weiter umgesetzt und auf diesem Weg das Auxiliar vom Peptid abgelöst.

radikalische Deselenierung initiiert wird und anschließend analog dem vorgeschlagenen Mechanismus der 2MPE-Auxiliar-Abspaltung (Abbildung 38/39 mit S = Se) verlaufen würde. Aufgrund der geringen Stabilität von C-Se-Bindungen, im Vergleich zu C-S-Bindungen, müsste die radikalische Deselenierung rascher erfolgen als die radikalische Entschwefelung am 2MPE-Auxiliar (Abbildung 53C). Demnach sollte das Benzylradikal **118** zügig generiert werden und dieses anschließend durch Reaktion mit Sauerstoff und TCEP weiter umgesetzt werden. Analog zur Abspaltung des 2MPE-Auxiliars wird im letzten Schritt das native Peptid **125** durch Aminolyse der N-Formyl-Peptidspezies **122** erhalten.

Um die Anwendbarkeit und potentiellen Vorteile des 2SPE-Auxiliars zu überprüfen, musste zunächst die Synthese eines geeigneten Auxiliarvorläufermoleküls erarbeitet werden. Wie in Kapitel 4.2 gezeigt werden konnte, ermöglichte der Einsatz von Aldehyd-basierten Vorläufermolekülen stets einen zuverlässigen Zugang zu den gewünschten Auxiliarpeptiden (reduktive Aminierung auf der Festphase). Aus diesem Grund konzentrierten sich erste Arbeiten auf die Synthese des Paramethoxybenzyl (PMB)-Se-geschützten Phenylacetylaldehyds **168** (Abbildung 54A). Analog zu den bereits erarbeiteten Aldehyd-Synthesen (Kapitel 4.2) sollte die Freisetzung der Aldehyd-Funktion durch die selektive Reduktion eines

Weinrebamids ermöglicht werden. Aus diesem Grund wurde die Reaktion des α -Bromphenylacethydroxylamids **81** mit dem Diselenid **169** untersucht (Abbildung 54A/B). Die Chemie von Organoselenol-Verbindungen ist durch deren hohes Oxidationspotential geprägt, wodurch Alkyl- und Arylselenole in der Regel nur in Form der entsprechenden Diselenide isoliert werden können. Für nachfolgende Reaktionen werden die Diselenide entweder unmittelbar vor deren Verwendung oder *in-situ* reduziert und dabei die reaktiven, nukleophilen Selenole generiert. Für die Synthese des 2SPE-Auxiliärvorläufermoleküls wurde das Diparamethoxybenzylidiselenid **169** in einem THF/MeOH-Gemisch unter Argon-Schutzgasatmosphäre gelöst und durch Zugabe von NaBH₄ bei 0°C reduziert (Abbildung 54B). Die vollständige Bildung des Selenols **166** wird in diesem Schritt durch die Entfärbung der zuvor gelben Lösung angezeigt. Anschließend wurde das Alkylbromid **81** zugegeben und das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 16 h wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt und die erhaltenen Produkte analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Reaktion nicht das gewünschte Produkt **167** sondern ausschließlich das Phenyl-acethydroxylamid **170** lieferte. Die Analyse des Reaktionsfortschrittes mit Hilfe der Dünnschicht-chromatographie bestätigte, dass das Nebenprodukt **170** unmittelbar bzw. nach kurzer Reaktionszeit gebildet wird. Im Gegensatz dazu wurde in Abwesenheit des Diselenids **169** nur ein geringer Umsatz des Alkylbromids **81** in das Nebenprodukt **167** beobachtet. Es wurde vermutet, dass zunächst der gewünschte Selenoether **167** durch Reaktion des Selenols **166** mit dem Startmaterial **81** gebildet wird und anschließend die aufgebaute, aber labile, C-Se-Bindung unter den reduktiven Bedingungen (verbleibendes NaBH₄ oder gelöster Wasserstoff) zügig gespalten wird. Dieses Ergebnis war überraschend, da in Arbeiten von *Payne et al.* der strukturell ähnliche Selenoether **171** (Abbildung 54C) in Gegenwart von NaBH₄ bei Raumtemperatur lange Zeit (über Nacht-Reaktion) stabil war.^[44b] Es wurde vermutet, dass die geringe Stabilität der C-Se-Bindung möglicherweise durch den elektronenziehenden Effekt der benachbarten Carbonyl-Funktion verursacht wird. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die Synthese des 2SPE-Auxiliar-Vorläufermoleküls **168** aufgrund der reduktiv spaltbaren C-Se-Bindung keinesfalls über die Reduktion eines Weinrebamids erfolgen sollte, welche den Einsatz von starken Reduktionsmitteln erfordert. Aus diesem Grund wurden die Synthese des gewünschten Auxiliärvorläufermoleküls **168** durch Verwendung des Dimethoxyacetals **172** erprobt (Abbildung 54D): In diesem Fall wird eine elektronen-ziehende Carbonyl-Gruppe in Nachbarschaft des Selenoethers vermieden und damit einer möglichen

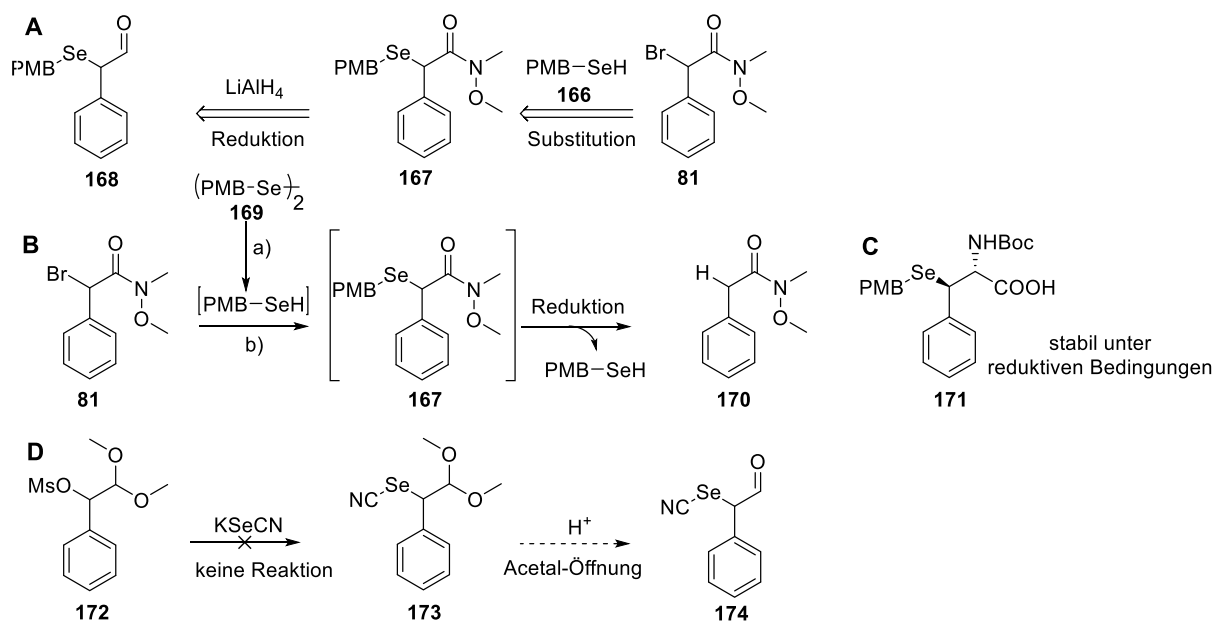


Abbildung 54: Weinrebamid-basierte Synthesestrategie des PMB-geschützten Aldehyds **168** (A). Die Reaktion des Alkylbromids **81** liefert unter reduktiven Bedingungen ausschließlich das Nebenprodukt **169** (B). Im Gegensatz zu dem Weinrebamid **167** ist die C-Se-Bindung des Phenylalanin-Derivates **171** in Gegenwart von NaBH_4 stabil (C).^[44b] Die Synthese der gewünschten Aldehyds **174** scheiterte an der geringen Reaktivität des Mesylates **172** (D). Bedingungen: a) NaBH_4 , THF, MeOH, 0°C ; b) Zugabe von **81** in THF, RT.

Destabilisierung der C-Se-Bindung vorgebeugt. Zusätzlich sollte die Aldehyd-Funktion unter sauren Bedingungen freigesetzt werden, wodurch im Gegensatz zur Weinrebamid-Strategie (Abbildung 54A) der Einsatz starker Reduktionsmittel vermieden wird. Die Verwendung des Dimethoxyacetals führte jedoch nicht zum Erfolg, da eine nukleophile Substitution am Mesylat **172** durch das reaktive Kaliumselenocyanat, selbst bei hohen Temperaturen ($>75^\circ\text{C}$) und der Verwendung von Kronenethern (Komplexierung von Kalium), nicht erreicht wurde. Demnach scheint der elektronenschiebende Effekt der benachbarten Acetalfunktion die nukleophile Substitutionsreaktion zu verhindern.

Daraufhin wurde die Synthese des PMB-geschützten 2-Selenol-phenylethylamins **179** als 2SPE-Vorläufermolekül von Glycinauxiliarpeptiden erarbeitet (Abbildung 55A): Auch in diesem Fall wird eine elektronenziehende Carbonyl-Gruppe in Nachbarschaft des Selenoethers **178** vermieden, um die Stabilität der C-Se-Bindung nicht zu gefährden. Nach einer Vorschrift von *Zwierzack et al.* wurde durch Aminobromierung von Styrol (**175**) mit der Dibromverbindung **176** das gewünschte Additionsprodukt **177** erhalten (Ausbeute 52%).^[109] Die anschließende Reaktion des Alkylbromids **177** mit dem Diselenid **169** in Gegenwart von NaBH_4 lieferte den gewünschten Selenoether **178** mit einer Ausbeute von 55%. Trotz der

Verwendung von NaBH_4 im Überschuss wurde keine Reduktion der C-Se-Bindung des Selenoethers **178** beobachtet. Dies bestätigt die Annahme, dass die zuvor beobachtete Reduktion des Weinrebamid-funktionalisierten Selenoethers **167** auf den elektronenziehenden Effekt der benachbarten Carbonylfunktion zurückzuführen ist. Durch Acidolyse mit 4 M HCl in Dioxan wurde das gewünschte primäre Amin **179** in Form des entsprechenden Hydrochlorids erhalten (81% Ausbeute). Im nächsten Schritt sollte das 2-SPE-Auxiliar auf dem Harz-gebundenen und N-terminalen α -Bromacetylpeptid **180** eingeführt werden (Abbildung 55B). Dazu wurde das Hydrochlorid durch Behandlung mit einer wässrigen, gesättigten NaHCO_3 -Lösung zunächst in das freie Amin **179** überführt (92% Ausbeute), um eine Inaktivierung des N-terminalen α -Bromacetyl-Restes durch Chlorid-Ionen (Bildung eines weniger reaktiven Chloressigsäure-Restes) zu vermeiden. Die Substitutionsreaktion erfolgte in DMF in Gegenwart von DIPEA (30 Äq.) und mit einem Überschuss des 2SPE-Auxiliar-Vorläufermoleküls **179** (10 Äq.). Die UPLC-Analyse des nach der TFA-Behandlung erhaltenen Rohproduktes bestätigte einen vollständigen Umsatz des Startmaterials und die erfolgreiche Bildung des PMB-geschützten-Auxiliarpeptids **181**. Anschließend erfolgte die Abspaltung des

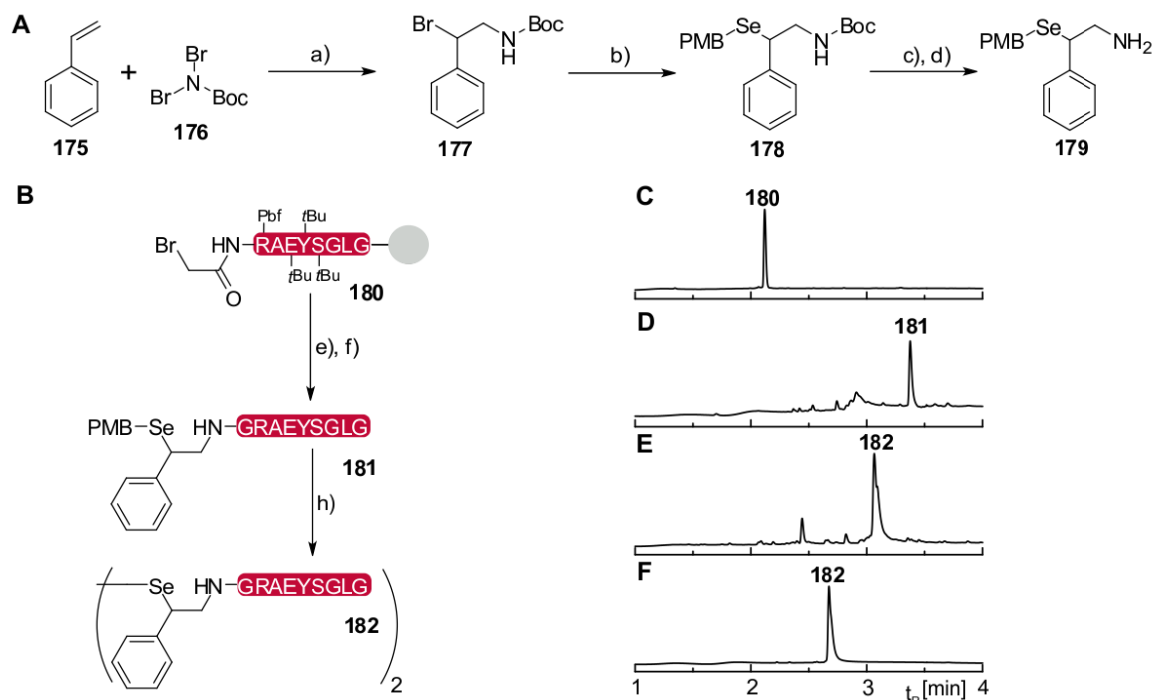


Abbildung 55: Synthese des Vorläufermoleküls **179** (A) und des 2SPE-Auxiliarpeptids **182** (B). UPLC-Analyse vor (C) und nach (D) der Einführung des 2SPE-Auxiliars, nach der Entfernung der PMB-Schutzgruppe (E) und des gereinigten Auxiliarpeptids **182** (F), welches als Diselenid erhalten wird. Bedingungen: a) DCM, 40°C, 52%; b) $(\text{PMB-Se})_2$, NaBH_4 , EtOH, RT, 55%; c) 4 M HCl in Dioxan, RT, 81%; d) ges. NaHCO_3 , dann Extraktion mit DCM, 92%; e) **179**, DIPEA, DMF, RT; f) TFA/Wasser (9/1; v/v), RT; h) I_2 in MeOH/Wasser (1/1; v/v), RT, 29% (3 Stufen).

PMB-geschützten Auxiliärpeptids **181** vom Harz mit 90% TFA (10% Wasser) bei Raumtemperatur. Die Verdünnung der TFA durch Zugabe von Wasser (10 Vol.-%) verhinderte die frühzeitige Spaltung des PMB-Ethers, was unter den stark sauren Bedingungen stets zu oxidierten Nebenprodukten führte. Das Rohprodukt wurde in Ether präzipitiert und mit einer jodhaltigen Lösung (10 Äq. I_2 in $H_2O/MeOH$ (1/1, v/v)) bei Raumtemperatur behandelt. Unter diesen Bedingungen wurde die PMB-Schutzgruppe entfernt und 2SPE-Auxiliärpeptid **182** als symmetrisches Diselenid erhalten. Die anschließende präparative HPLC-Reinigung des Rohproduktes lieferte das gewünschte Auxiliärpeptid **182** mit einer Ausbeute von 29%.

Im nächsten Schritt sollte die Anwendung des 2SPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen untersucht werden. Dazu wurde das Diselenid **182** mit dem Alaninpeptidthioester **22A** in Ligationspuffer (20 mM TCEP, 200 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei Raumtemperatur zu Reaktion gebracht (Abbildung 56A). Unter diesen Bedingungen wurde jedoch die oxidative Deselenierung des Startmaterials beobachtet (Abbildung 56C). Die Nebenreaktion erfolgte rasch und lieferte in weniger als zwei Minuten die ungewünschte Alkohol-Auxiliärpeptidspezies **183** als Hauptprodukt. Aus Arbeiten von *Payne et al.* ist bekannt, dass die oxidative Deselenierung durch Reaktion des Alkylselenols mit TCEP (Deselenierung) eingeleitet wird.^[45] Da auch in diesem Experiment die Bildung des TCEP-Selenids **185** nachgewiesen werden konnte (Abbildung 56C), scheint die oxidative Deselenierung des 2SPE-Auxiliärpeptids **182** durch das verwendete TCEP des Ligationspuffers verursacht zu werden.

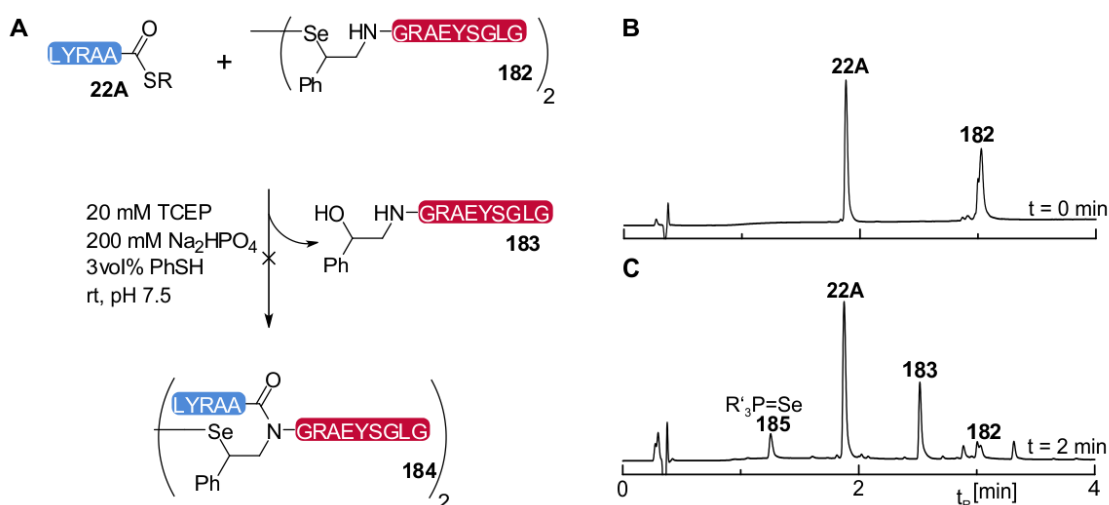


Abbildung 56: ENCL-Reaktion zwischen dem Peptidthioester **22A** und dem 2SPE-Auxiliärpeptids **182** (A). UPLC-Analyse vor (B) und nach zwei Minuten (D) Reaktionszeit. In Gegenwart von TCEP wird das Auxiliärpeptid **182** durch oxidative Deselenierung in das Nebenprodukt **183** überführt.

Um diese Nebenreaktion zu umgehen, wurde auf das Prinzip der sogenannten Selenocystein-Selenoester-Ligation^[46] zurückgegriffen, welche von der Arbeitsgruppe Payne entwickelt wurde (Abbildung 57): Dabei werden Selenocysteinpeptide mit Peptidselenoestern verknüpft. Die Methode ermöglicht quantitative Umsätze der Verknüpfungsreaktionen in nur wenigen Minuten (1-10 min) und benötigt keine externen Reduktionsmittel (wie TCEP) oder Thioladditive. Die notwendige Reduktion des Selenocysteinpeptid-Dimers erfolgt vermutlich durch eine Redox-Reaktion mit dem Peptidselenoester. Allerdings ist der Mechanismus dieser Ligationmethode nicht vollständig aufgeklärt. Die Autoren vermuteten, dass die schnellen Verknüpfungsreaktionen durch die Bildung des schwerlöslichen Diphenyldiselenids ermöglicht werden. Im Anschluss an die Peptidligation kann die Selenol-Funktion entfernt werden (Deselenierung), wodurch ein Alanin-Rest an der Verknüpfungsstelle erhalten wird.^[46]

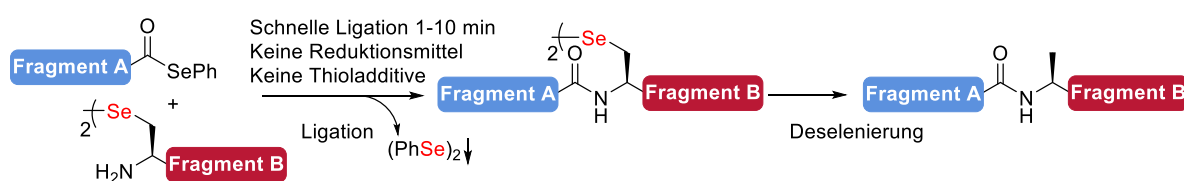


Abbildung 57: Konzept der Selenocystein-Selenoester-Ligation: Die Verknüpfungsreaktionen erfolgen in wenigen Minuten und benötigen keine externen Reduktionsmittel oder Thioladditive. Als Triebkraft der Reaktion wird die Bildung des schwerlöslichen Diphenyldiselenids vermutet. Nach Abtrennung des Diselenids kann durch Deselenierung ein Alanin-Rest an der Ligationstelle erhalten werden.^[46]

Mit dem Ziel das 2SPE-Auxiliapeptid **182** in einer analogen Verknüpfungsreaktion verwenden zu können, wurde der benötigte Glycinselenoester **187** nach einer Synthesevorschrift von Payne *et al.* dargestellt (siehe Kapitel 6.16.).^[46] Anschließend wurde das 2SPE-Auxiliarpeptid **182** mit dem Selenoester **187** in Ligationspuffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 6.5) bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht (Abbildung 58A). Die UPLC-Analyse bestätigte die erfolgreiche Verknüpfung der Peptidfragmente, wobei das Ligrationsprodukt in Form des symmetrischen (**186**) und unsymmetrischen (**189**) Diselenids erhalten wurde (Abbildung 58C). Bei 2 mM Konzentration der Peptidfragmente erreichte die Reaktion bereits nach zwei Minuten einen vollständigen Umsatz. Durch eine Erhöhung der Peptidkonzentration (5 mM) konnte die Reaktionszeit auf zwei Minuten verkürzt werden (siehe Kapitel 6.16.3.). Im Vergleich dazu benötigte das 2MPE-Auxiliar fast eine Stunde zum Aufbau der Gly-Gly-Amidbindung des sequenzanalogen Ligrationsproduktes **86GG** (Kapitel 4.2.2). Damit

ermöglicht das 2SPE-Auxiliar deutlich schnellere Verknüpfungsreaktionen als dessen Thiol-Analogon. Zusätzlich können die Peptidligationen ohne externe Reduktionsmittel oder (übelriechende und giftige) Thioladditive durchgeführt werden. Im nächsten Schritt wurde die Abspaltung des 2SPE-Auxiliars, im direkten Anschluss an die Peptidligation, untersucht. In Arbeiten von *Payne et al.* wurde das im Zuge der Peptidligation gebildete Diphenyldiselenid als störend für die nachfolgende Deselenierungsreaktion identifiziert und daher mit Hexan aus der Ligationslösung extrahiert.^[46] Da die Abspaltung des 2SPE-Auxiliars ebenfalls durch eine radikalische Deselenierungsreaktion initiiert wird, wurde das Diphenyldiselenid aus dem Reaktionsgemisch durch Extraktion entfernt und anschließend mit einer wässrigen Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) versetzt. Auf diese Weise wurde das 2SPE-Auxiliar bei Raumtemperatur in weniger als einer Stunde vollständig und mit hoher Selektivität (91%) vom Ligationsprodukt **186** (bzw. **189**) entfernt (Abbildung 58E). Im Vergleich dazu lieferte die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars nach ebenfalls einer Stunde und unter analogen Reaktionsbedingungen nur 13% des nativen Peptids **30**, obwohl die Reaktion an einem gereinigten Ligationsprodukt untersucht wurde (Abschnitt 4.2.3). Um die Entfernung des 2SPE-Auxiliars in noch kürzerer Zeit zu ermöglichen, wurde die Reaktion bei erhöhter Temperatur (40°C) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen wurde das SPE-Auxiliar bereits nach 45 Minuten vollständig und mit unverändert hoher Selektivität (91%) entfernt (siehe Kapitel 6.16.3.). Im Vergleich dazu wurden 36 h benötigt, um das 2MPE-Auxiliar unter analogen Bedingungen im direkten Anschluss an die Peptidligation zu entfernen (Abschnitt 4.2.3). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Peptidligation als auch die Auxiliarabspaltungsreaktion am 2SPE-Grundgerüst deutlich rascher erfolgen als an dessen Thiol-Analogon, dem 2MPE-Auxiliar. Interessanterweise konnte im frühen Verlauf (15 Minuten Reaktionszeit) der Auxiliarabspaltung die Bildung der *N*-Formyl-Peptidspezies **124** beobachtet werden (Abbildung 58D), welche bereits in Kapitel 4.2.8 als zentrales Intermediat der 2MPE-Auxiliarabspaltungsreaktion diskutiert wurde. Der UPLC-Analyse zur Folge wird dieses Zwischenprodukt innerhalb von 60 Minuten in das native Peptid **30** überführt (Abbildung 58E). Im Gegensatz dazu konnte dieses Intermediat am Thiol-Auxiliar (2MPE) nur durch Zugabe eines Radikalstarters nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.8). Es wurde vermutet, dass die radikalische Deselenierung und die nachfolgenden Radikalreaktionen am 2SPE-Auxiliar so schnell zu verlaufen, dass die Aminolyse der *N*-Formyl-Peptidspezies **124**

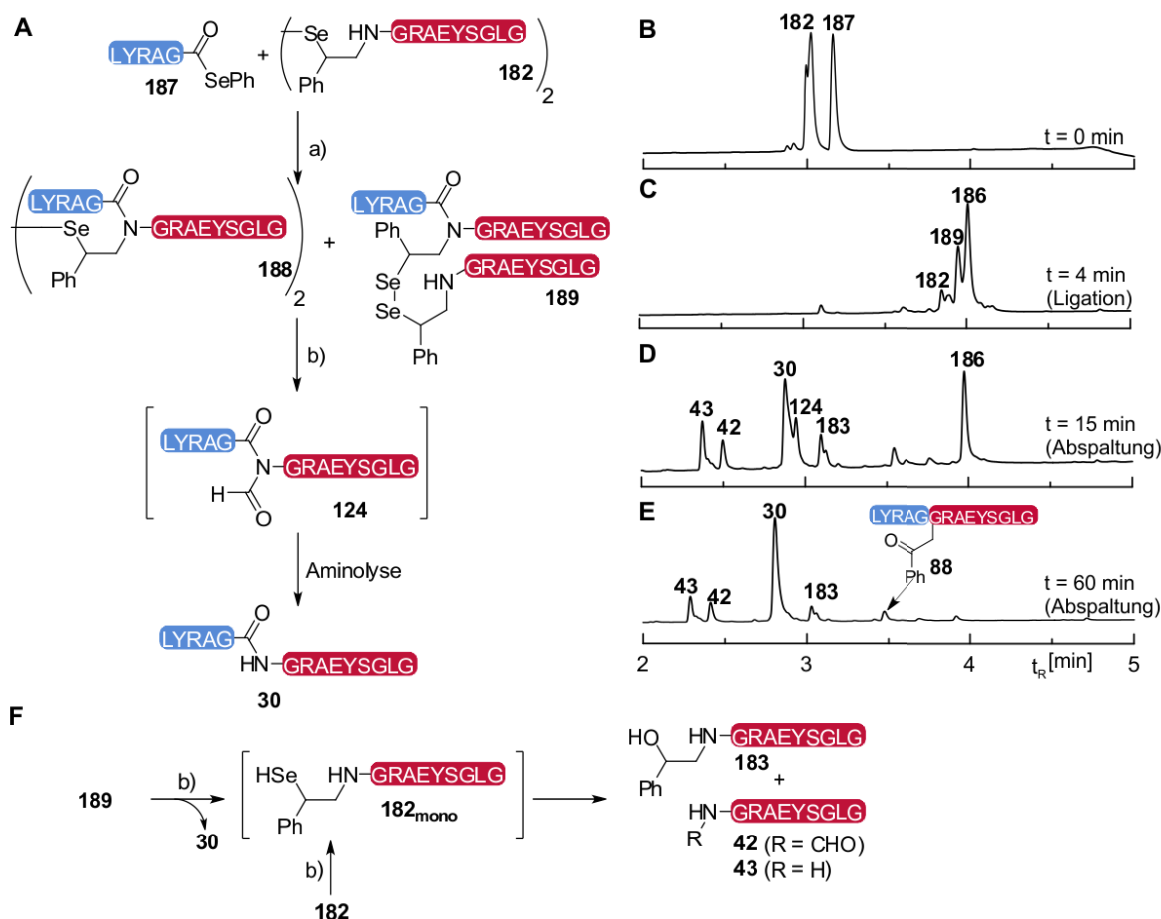


Abbildung 58: Anwendung des 2SPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): Im ersten Schritt wird der Selenoester **187** mit dem Auxiliarpeptid **182** verknüpft und anschließend das 2SPE-Auxiliar vom Ligrationsprodukt **186** (bzw. **189**) abgespalten. UPLC-Analysen vor (B) und nach (C) der Ligation, sowie nach 15 Minuten (D) und 60 Minuten (E) der Auxiliar-Abspaltungsreaktion. Das unsymmetrische Diselenid **189** wird im Verlauf der Auxiliarabspaltung in das native Peptid **30** und die Nebenprodukte **42**, **43** und **183** überführt. Bedingungen: a) Peptidkonzentration = 2 mM; 6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, RT, pH 6.5; b) Peptidkonzentration = 0.5 mM, 2 M TCEP, 0.8 M Morpholin, pH 8.5, RT.

(siehe Abbildung 53) zum geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Auxiliarabspaltungsreaktion wird. Auch wenn die Entfernung des 2SPE-Auxiliars mit hoher Selektivität erfolgte, konnten im Reaktionsgemisch geringe Mengen des Acetophenon-tragenden Verknüpfungsproduktes nachgewiesen werden, welches bereits zuvor im Fall des 2MPE-Auxiliars beobachtet wurde (Kapitel 4.2.3). Zusätzlich wurden drei weitere Reaktionsprodukte (**42**, **43**, **183**, Abbildung 58F) identifiziert, welche bereits innerhalb der ersten 15 Minuten vollständig gebildet werden. Die Nebenprodukte sind für die Selektivität der Auxiliar-Abspaltung nicht relevant, da deren Ursprung auf verbleibendes Auxiliarpeptid **182** und das unsymmetrische Diselenid **189** zurückzuführen ist (Abbildung 58F). Beide Verbindungen müssten unter den Bedingungen der Auxiliar-Abspaltung (Reduktion mit TCEP) das freie Selenol **182_{mono}** liefern. Die beobachteten Nebenprodukte werden vermutlich durch nachfolgende oxidative

Deselenierung (\rightarrow **183**) oder teilweiser (\rightarrow **43**) bzw. vollständiger (\rightarrow **42**) Entfernung des 2SPE-Auxiliars erhalten.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel erstmals die Synthese und Anwendung eines N^α-Auxiliars beschrieben, welches die Peptidligation über eine Selenol-Funktion vermittelt. Die Verknüpfungsreaktion zwischen dem 2SPE-Auxiliarpeptid **182** und dem Peptidselenoester **187** benötigte nur zwei Minuten zum Aufbau des Gly-Gly-verknüpften Ligationsproduktes **186**. Zusätzlich konnte das 2SPE-Auxiliar im direkten Anschluss an die Peptidligation in weniger als einer Stunde entfernt werden. Damit ermöglicht das Selenol-funktionalisierte 2SPE-Auxiliar deutlich schnellere Peptidligationen und Auxiliar-Abspaltungsreaktionen als das Thiol-funktionalisierte 2MPE-Grundgerüst. Auch wenn durch Verwendung des PMB-Se-geschützten Phenylethylamins **179** die Synthese auf Auxiliarpeptide mit einem N-terminalen Glycin-Rest beschränkt wurde, zeigen die Ergebnisse das hohe Potential von Selenol-funktionalisierten N^α-Auxiliaren für die ENCL.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Die chemische Totalsynthese ermöglicht einen zuverlässigen Zugang zu Peptiden und Proteinen mit definierter Struktur und hoher Reinheit. Im Gegensatz zu biotechnologischen Methoden ermöglicht die chemische Peptid- und Proteinsynthese den Einbau von nahezu jeder beliebigen funktionellen Gruppe und das mit atomarer Präzision. Damit können die Zielstrukturen beispielsweise mit fluoreszierenden Reportergruppen versehen oder deren biologische Eigenschaften (Stabilität, Funktion) gezielt manipuliert werden. Zusätzlich können auf diesem Weg posttranslationale Proteinmodifikationen ortsspezifisch eingeführt und dadurch deren Einfluss auf die Funktion und Struktur eines Proteins untersucht werden. Die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen wurde durch die Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese erheblich vereinfacht. Allerdings ist die Reichweite dieser linearen Synthesemethode begrenzt und daher für die Synthese von großen Proteinstrukturen häufig nicht anwendbar. Zusätzlich kann die Festphasenpeptidsynthese bereits bei relativ kurzen Zielpeptiden ("schwierigen Sequenzen") durch Aggregation der wachsenden Peptidkette erfolglos verlaufen. In beiden Fällen kann der Einsatz von chemoselektiven Peptidfragmentverknüpfungsmethoden (konvergenten Synthesestrategie) hilfreich sein, um die Probleme einer linearen Synthese zu umgehen. Dabei werden zunächst kurze Peptid- oder Proteinfragmente mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese aufgebaut und anschließend miteinander zum Volllängenpeptid- oder protein verknüpft. Eine häufig verwendete Methode ist die native chemische Peptidligation (Kapitel 2.2.1):^[7] Dabei wird ein ungeschützter α -Peptidthioester mit einem ungeschützten Cysteinylpeptid verknüpft. Die Peptidligationen verlaufen rasch, in wässrigen Puffern, unter milden Reaktionsbedingungen sowie vollständig chemo- und regioselektiv. Allerdings kann diese Methode nur an cysteinhaltigen Ligationsstellen eingesetzt werden, welche unter Umständen nicht im Zielprotein vorkommen. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten eine Vielzahl chemoselektiver Peptidfragmentverknüpfungsmethoden entwickelt, welche keinen Cystein-Rest an der Ligationstelle benötigen (Kapitel 2.2.2). Im Fall der Ligations-Entschwefelungs-Strategie werden anstelle von Cystein Thiol-funktionalisierte Aminosäuren für die Peptidligation genutzt. Der intensiven Forschungsleistung unterschiedlicher Arbeitsgruppen ist es zu verdanken, dass diese Methode der erweiterten

nativen chemischen Peptidligation (ENCL) bereits an 13 der 19 proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Cystein) eingesetzt werden kann. Der wesentliche Nachteil der Ligations-Entschwefelungsstrategie besteht darin, dass für jede einzelne Aminosäure ein individueller Thiol-modifizierter Baustein für die SPPS verwendet werden muss und diese nur in Ausnahmefällen (drei von 13) kommerziell verfügbar sind. Im Gegensatz dazu benötigt die Auxiliar-vermittelten Peptidligation theoretisch nur ein einziges Hilfsmolekül, um Verknüpfungsreaktionen an jeder beliebigen Ligationsstelle zu ermöglichen. Demnach würde diese ENCL-Methode ein universelles Werkzeug für die Peptidligation liefern. Dieses Versprechen konnte jedoch in der Praxis nicht erfüllt werden. In den vergangenen 20 Jahren wurde zwar eine Vielzahl unterschiedlicher N^α-Auxiliare beschrieben. Allerdings ermöglichen diese Hilfsmoleküle lediglich Peptidligationen sofern ein Glycin-Rest an der Verknüpfungsstelle vorhanden ist, wodurch deren Einsatz erheblich eingeschränkt wird. Ein weiteres Problem besteht darin, dass die meisten N^α-Auxiliare durch den Einsatz starker Säuren, oder in einigen Fällen mit Supersäuren oder Fluorwasserstoff, entfernt werden müssen. Unter diesen Bedingungen wurde bereits die Spaltung des Zielpeptids als unerwünschte Nebenreaktion beschrieben. Zusätzlich scheidet der Einsatz von säurelabilen N^α-Auxiliare grundsätzlich aus, wenn die Synthese von Proteinen mit säureempfindlichen funktionellen Gruppen als Ziel gesetzt wird. Damit konnte durch bisher verfügbare N^α-Auxiliare nur ein Bruchteil des Potentials dieser vielversprechenden ENCL-Methode genutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten leistungsfähige N^α-Auxiliare entwickelt werden, welche unter mild-basischen Bedingungen entfernt und für sterisch anspruchsvolle Verknüpfungsreaktionen, jenseits von Glycin, eingesetzt werden können. Dazu wurde in zunächst die Anwendung der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare **1a-c** untersucht (Abbildung 59). Die Abspaltung der Auxiliare sollte in Gegenwart von Base durch Deprotonierung des aciden Wasserstoff-Atoms in Nachbarschaft der elektronenziehenden Gruppe und der darauffolgenden Eliminierungsreaktion gelingen (Kapitel 4.1.1.). Zusätzlich würde das flexible Grundgerüst dazu beitragen, dass auch sterisch anspruchsvolle Verknüpfungsreaktionen ermöglicht werden, welche in diesem Fall über einen 6-gliedrigen Übergangszustand (S→N-Acyltransfer) erfolgen.

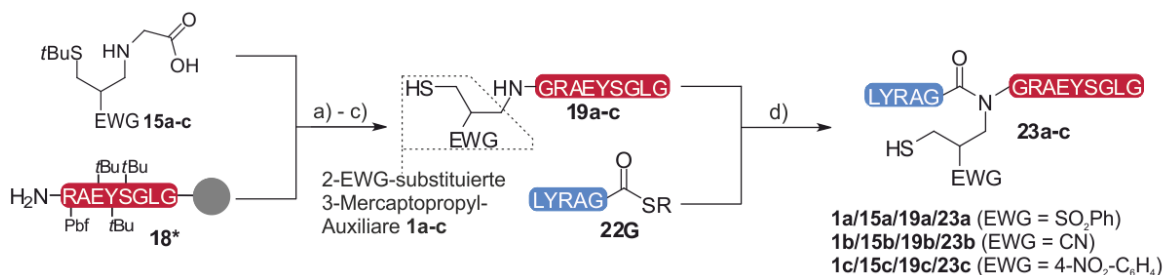


Abbildung 59: Synthese der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliarpeptide **19a-c** und deren Anwendung in der ENCL. Bedingungen: a) **15a-c**, PyBOP, DIPEA, DMF, RT; b) TFA/TIS/Wasser (95/2.5/2.5, v/v/v) c) für **19a/19c**: TFMSA/TFA/Anisol (8/1/1, v/v/v), 0°C; für **19b**: Hg(OAc)₂ (2 Åq.) in TFA, 0°C, dann DTT (4 Åq.); d) 20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, RT, pH 7.5, 3 Vol.-% PhSH.

Durch die Verwendung geeigneter Auxiliar-Aminosäure-Konjugate (**15a-c**; Abbildung 59) wurden die benötigten Auxiliarpeptide **19a-c** erhalten (Kapitel 4.1.2) und diese erfolgreich in ENCL-Reaktionen mit dem Glycinpeptidthioester **22G** eingesetzt (Kapitel 4.1.3). Die anschließende Entfernung der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare **1a-c** verlief jedoch ohne Erfolg, obwohl der Einsatz von starken Basen und erhöhter Temperatur getestet wurde (Kapitel 4.1.4). Es wurde festgestellt, dass die Grundgerüste unter basischen Bedingungen zur Eliminierung von Dihydrogensulfid neigen und damit die Abspaltung der Auxiliare verhindert wird. Interessanterweise wurden die Nitril- und Nitrophenyl-substituierten Auxiliare (**1b** und **1c**) unter basischen Bedingungen entfernt, sobald das Trialkylphosphin TCEP zugesetzt wurde und lieferten auf diesem Weg das gewünschte native Peptid **30**. Die Reaktion verlief besonders selektiv am 6NP-Auxiliar **1c** (Abbildung 60D) und konnte zusätzlich im direkten Anschluss an die Peptidligation, durch Zugabe von TCEP und Morpholin, durchgeführt werden. Die zweistufige Reaktionsabfolge (Ligation & Auxiliar-Abspaltung) umgeht die Notwendigkeit der sonst üblichen intermediären HPLC-Reinigung des Ligationsproduktes, wodurch der Zeitaufwand der Synthese verringert und die Gesamtausbeute gesteigert wird. Diese "Eintopf"-Variante wurde durch bisher verfügbare N^α-Auxiliare nicht ermöglicht. Allerdings wurde in Arbeiten von Dipl. Chem. Kathleen Hennig gezeigt, dass die erfolgreiche Anwendung der 2-Elektronenakzeptor-substituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliare (**1a** und **1c**) mindestens einen Glycin-Rest an der Ligrationsstelle voraussetzt.^[87]

In Kapitel 4.1.5 wurde der Einsatz des para-Nitrophenyl-Restes für einen weiteren Typ von basenlabilen N^α-Auxiliaren untersucht (Abbildung 60A). Das 5NP-Auxiliar **1d** sollte ebenfalls

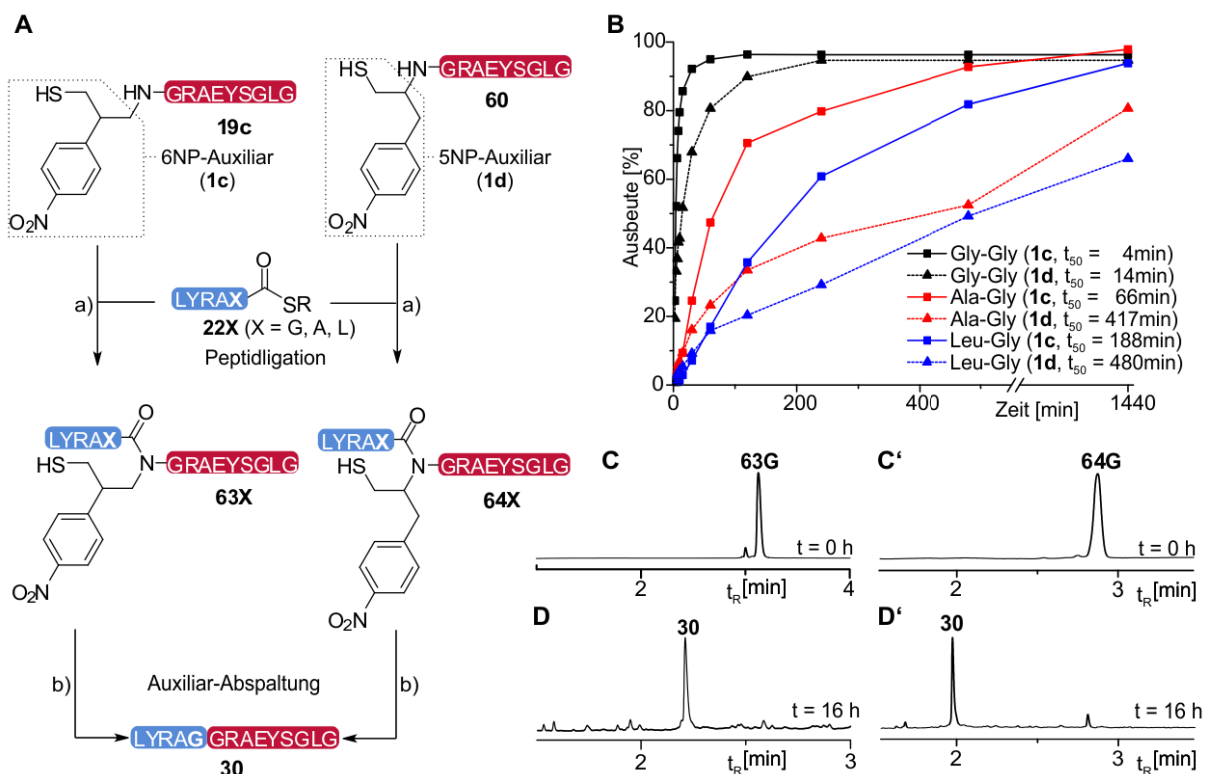


Abbildung 60: Anwendung der basenlabilen Auxiliare **1c** und **1d** in der ENCL (A): Im ersten Schritt wird der Peptidthioester **22X** mit dem Auxiliarpeptid **19c/60** verknüpft und anschließend das Auxiliar vom Ligrationsprodukt **63G/64G** entfernt. Zeitlicher Verlauf und ermittelte t_{50} -Werte (Zeit für 50% Ausbeute) der Verknüpfungsreaktionen von **19c/60** mit **22X** (D). UPLC-Analysen vor (C/C') und nach (D/D') der Auxiliarabspaltungsreaktion. Bedingungen a) Peptidkonzentration = 5 mM; 20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , RT, pH 7.5, 3 Vol.-% PhSH; b) X = G, Peptidkonzentration = 0.5 mM, 20 mM TCEP, 140 mM Morpholin, pH 9.5, 40°C.

unter basischen Bedingungen durch Deprotonierung des aciden Wasserstoffatoms und der anschließenden Eliminierungsreaktion entfernt werden. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Auxiliaren (**1a-c**) verläuft der S→N-Acyltransfer jedoch über einen 5-gliedrigen Übergangszustand. Um die aufwendige Synthese individueller Auxiliar-Aminosäure-Konjugate zu umgehen, wurde das 5NP-Auxiliar **1d** durch reduktive Aminierung des S-*t*Bu-geschützten Ketons **59** im letzten Schritt der SPPS eingeführt (Kapitel 4.1.6). Im Vergleich zum 6-ringbildenden Nitrophenyl-Auxiliar **1c** reagierte das 5NP-Auxiliar langsamer (Abbildung 60B), was vermutlich auf das tertiäre Kohlenstoff-Atom (→erhöhter sterischer Anspruch) in direkter Nachbarschaft des N-terminalen Amins zurückzuführen ist (Kapitel 4.1.7). Wie bereits für das Nitrophenyl-substituierte 6NP-Auxiliar beobachtet, konnte das 5NP-Auxiliars in Gegenwart von TCEP und unter basischen Bedingungen selektiv entfernt werden (Abbildung 60D'). Auch die Abspaltung des 5NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation gelang problemlos (Kapitel 4.1.8). Wie in Arbeiten von B. Sc. Carmen Juds

gezeigt wurde, scheiterte das 5NP-Auxiliar ebenfalls an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsreaktionen und ist auf glycinhaltige Ligationstellen limitiert.^[88]

Zusammenfassend konnte durch die Entwicklung des 5NP- und 6NP-Grundgerüsts (**1c** und **1d**) eine Verbesserung (mild-basische Bedingungen & effiziente Eintopfvariante) der Auxiliar-vermittelten Peptidligation erreicht werden. Allerdings blieb die Reichweite dieser ENCL-Methode weiterhin auf einfache Verknüpfungsreaktionen (mindestens ein Glycin-Rest an der Ligationstelle) beschränkt. Der vorgeschlagene baseninduzierte Eliminierungsmechanismus musste jedoch einer kritischen Betrachtung unterzogen werden. Unterschiedliche Nebenprodukte und Kontrollexperimente mit Radikalfängern deuteten darauf hin, dass die Abspaltung der Nitrophenyl-Auxiliare (**1c** und **1d**) in Gegenwart von TCEP über einen radikalischen Mechanismus erfolgt (Kapitel 4.10).

Diese Überlegungen initiierten die Entwicklung der 2'-substituierten 2-Mercapto-ethyl-Auxiliare (**1e-g**), welche nach der Peptidligation über einen radikalischen Mechanismus entfernt werden sollten (Kapitel 4.2). Erste Arbeiten konzentrierten sich auf 2MPE-Auxiliar **1e**, da angenommen wurde, dass der Phenylsubstituent intermediäre Radikalintermediate stabilisieren und damit die Auxiliar-Abspaltung erleichtern würde. Der S-Dmt-geschützte Aldehyd **57** erwies sich als geeignetes Vorläufermolekül, um das 2MPE-Auxiliars durch reduktive Aminierung im Zuge der SPPS einzuführen (Kapitel 4.2.1). Ein wesentlicher Vorteil dieser Synthesestrategie ist, dass die Reaktion mit einer Vielzahl N-terminaler Aminosäuren kompatibel ist und damit die Synthese unterschiedlicher N-terminaler Auxiliarpeptide mit Hilfe eines einzigen SPPS-Bausteins ermöglicht wird. Im Vergleich zu dem 5NP- und 6NP-Auxiliar erfolgten die Peptidligationen am 2MPE-Grundgerüst deutlich schneller und führten selbst im Fall sterisch anspruchsvoller Verknüpfungsreaktionen, jenseits von Glycin, zum Erfolg (Kapitel 4.2.2). Damit stand mit dem 2MPE-Auxiliar erstmals ein N^α-Auxiliar zur Verfügung, dessen Anwendung nicht auf glycinhaltige Verknüpfungsstellen limitiert ist, sondern an nahezu jeder beliebigen Ligationstelle eingesetzt werden kann (Abbildung 61E). Zusätzlich konnte das 2MPE-Auxiliar unter mild-basischen Bedingungen (pH 8.5) in Gegenwart von TCEP und Morpholin mit hoher Selektivität entfernt und auf diesem Weg die gewünschten nativen Peptide erhalten werden (Kapitel 4.2.3). Die Abspaltung des 2MPE-Auxiliars verlief ebenfalls im direkten Anschluss an die Peptidligation erfolgreich (Kapitel

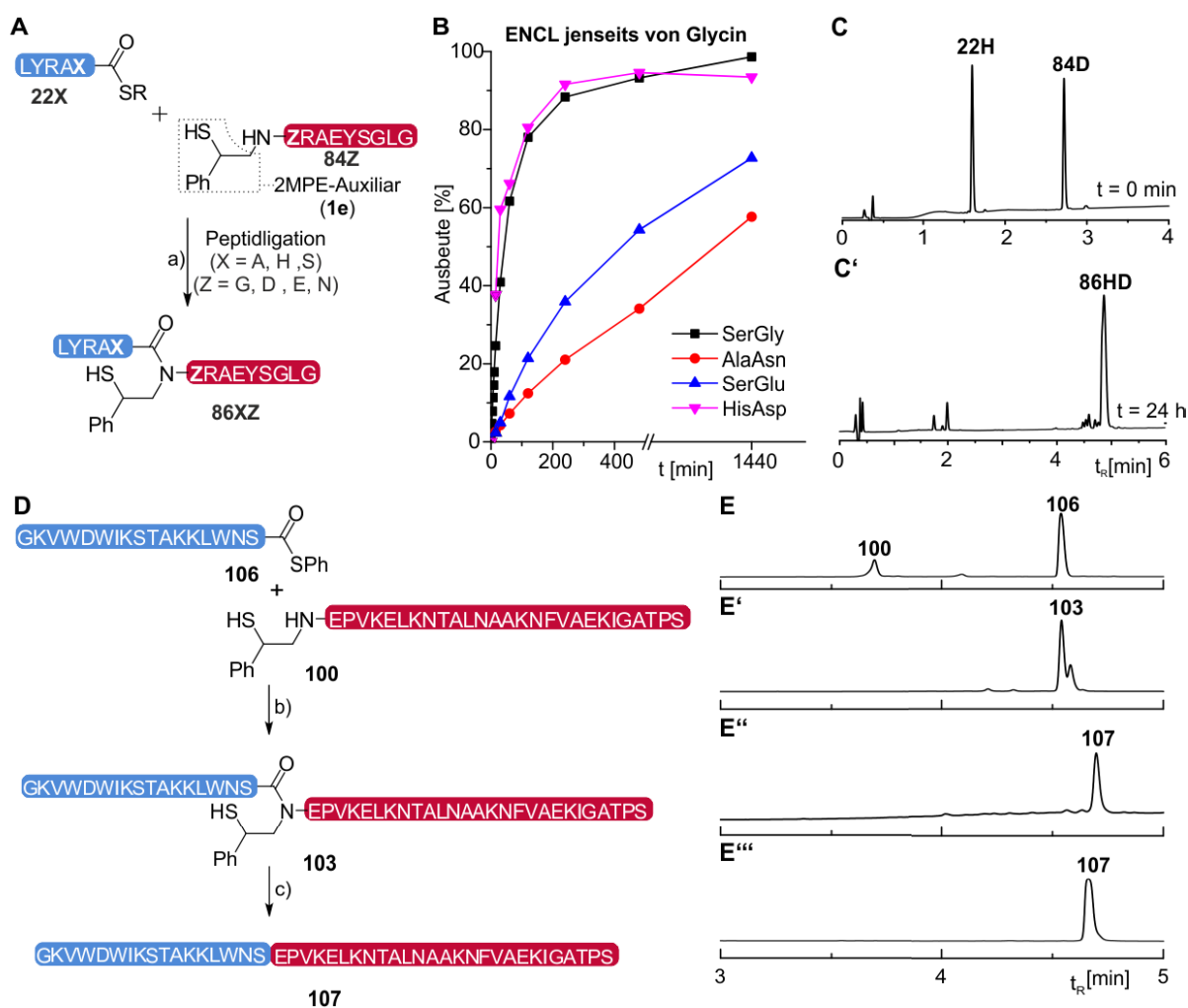


Abbildung 61: Anwendung des 2MPE-Auxiliars **1e** an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsstellen (A): Zeitlicher Verlauf ausgewählter Peptidligationen (B). UPLC-Analyse vor (C) und nach (C') der Peptidligation des Thioesters **22H** mit Auxiliarpeptid **84D**. Chemische Synthese von Opistoporin-2 durch Einsatz des 2MPE-Auxiliars (D). UPLC-Analyse vor der Peptidligation (D), des gereinigten Ligationsproduktes **103** (E'), nach der Auxiliar-Abspaltung (E'') und des gereinigten Opistoporin-2-Peptids **107** (E'''). Bedingungen: a) $c(\text{Peptide}) = 5 \text{ mM}$, 20 mM TCEP , $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH , $\text{pH } 7.5$, RT; b) $c(\text{Thioester}) = 4 \text{ mM}$, 20 mM TCEP , $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH } 6.8$, RT, 10 h ; c) $c(\text{Peptid}) = 0.125 \text{ mM}$, 0.3 M TCEP , 1.2 M Morpholin , $\text{pH } 8.5$, 40°C , 3 h .

4.2.4). Um den präparativen Nutzen der Methode zu demonstrieren, wurde das 2MPE-Auxiliar für die Synthese von zwei antimikrobiellen Peptiden, DCD-1L und Opistoporin-2 (Abbildung 61D), genutzt (Kapitel 4.2.5).

Ursprünglich wurde angenommen, dass das 2MPE-Auxiliar durch eine radikalische Entschwefelungsreaktion mit anschließender β -Eliminierung entfernt wird und dabei Styrol freigesetzt wird. Experimentelle Befunde weckten jedoch Zweifel an diesem vorgeschlagenen Auxiliar-Abspaltungsmechanismus. Aus diesem Grund wurde die Reaktion an einem ^{13}C -markierten 2MPE-Grundgerüst genauer untersucht (Kapitel 4.2.8). Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass das 2MPE-Auxiliar im Zuge der

Abspaltungsreaktion in Form von Benzaldehyd und *N*-Formylmorpholin freigesetzt wird. Die Identifizierung dieser Reaktionsprodukte und weitere Experimente deuten daraufhin, dass die Reaktion über Alkylperoxyradikale verläuft (Abbildung 62). Diese entstehen vermutlich durch Reaktion der kohlenstoffzentrierten Radikalintermediate **118/121** mit molekularem Sauerstoff und werden anschließend durch das in Überschuss eingesetzte TCEP desoxygeniert. Die dabei erhaltenen Alkoxyradikale **119/123** liefern in einer β -Fragmentierung Benzaldehyd und auch im späteren Verlauf der Reaktion durch Oxidation die *N*-Formyl-Peptidspezies **124**. Der verbleibende Formyl-Rest wird im letzten Schritt durch Morpholin (Aminolyse) oder Wasser (Hydrolyse) entfernt und dabei das native Peptid **125** erhalten.

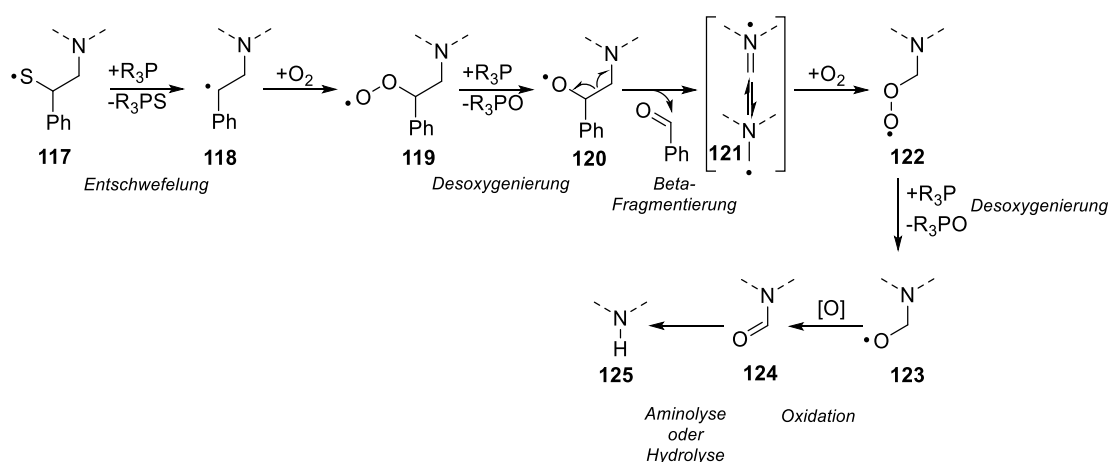


Abbildung 62: Möglicher Mechanismus zur oxidativen Abspaltung des 2MPE-Auxiliars: Die radikalische Entschwefelung und nachfolgende Reaktion des Benzylradikals **118** mit Sauerstoff liefert das Peroxyalkylradikal **119**, welches in Gegenwart von Phosphinen zum Alkoxyradikal **120** umgesetzt wird. β -Fragmentierung führt zur Bildung von Benzaldehyd und dem Amidomethylradikal **121**, welches durch Reaktion mit Sauerstoff und anschließender Desoxygenierung in das Alkoxyradikal **123** überführt wird. Durch Oxidation bildet sich die *N*-Formyl-Peptidspezies **124**, welche durch Aminolyse oder Hydrolyse in das native Peptid **125** überführt wird.

In Kapitel 4.2.9. wurde der Einsatz des 2ME- und des 2MP-Auxiliars **1f/1g** untersucht (Abbildung 63). Beide Hilfsmoleküle ermöglichten sterisch anspruchsvolle Verknüpfungsreaktionen (Abbildung 63A/A'). Die Peptidligationen verliefen am 2ME-Grundgerüst jedoch deutlich langsamer als am 2MPE-Auxiliar. Zusätzlich konnte das 2ME-Auxiliar nur vom Gly-Gly-verknüpften Ligationsprodukt **145GG** selektiv entfernt werden (Abbildung 63C). An anderen Verknüpfungsstellen (Ala-Asn, Gln-Phe) wurde stets die Spaltung des Zielpeptids als Nebenreaktion beobachtet. Ein ähnliches Problem wurde bei der Anwendung des 2MP-Auxiliars beobachtet: Das Grundgerüst ermöglichte zwar ähnlich rasche ENCL-Reaktionen wie das 2MPE-Auxiliar. Allerdings konnte das Auxiliar ebenfalls nur von der Gly-Gly-

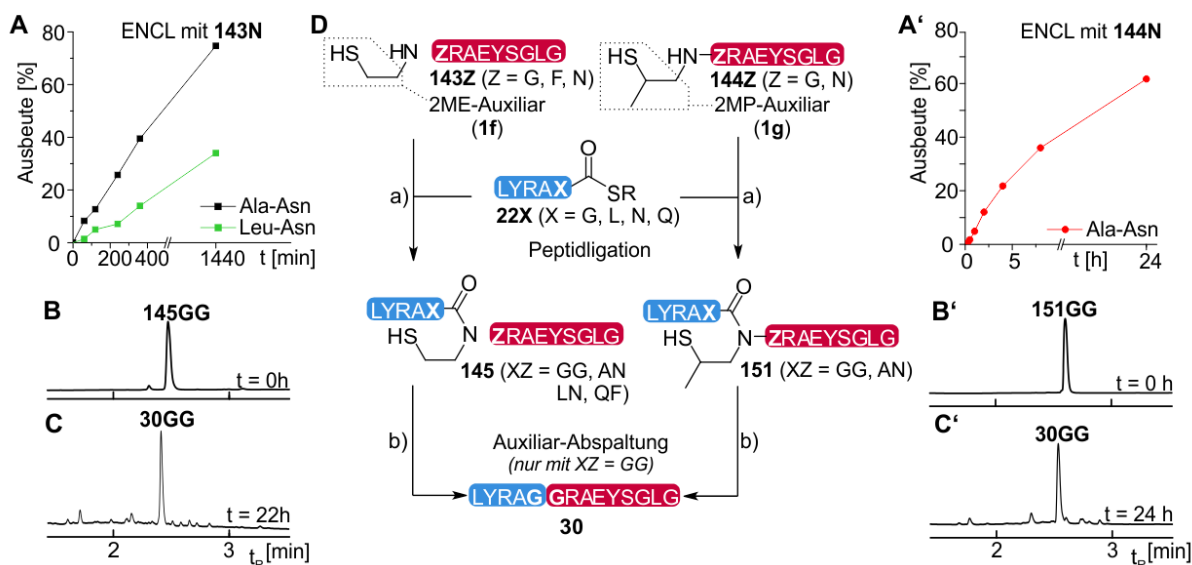


Abbildung 63: Anwendung des 2ME- und 2MP-Auxiliars **1f/g** in der ENCL (**D**): Im ersten Schritt wird der Peptidthioester **22X** mit dem Auxiliarpeptid **143Z/144Z** verknüpft und anschließend das Auxiliar vom Ligationsprodukt **145XZ/151XZ** entfernt. Zeitlicher Verlauf ausgewählter Peptidligationen (**A/A'**). UPLC-Analyse vor (**B/B'**) und nach (**C/C'**) Auxiliar-Abspaltungsreaktion. Bedingungen: a) c(Peptide) = 2–5 mM, 20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5, RT; b) c(Peptid) = 0.5 mM, 0.1 M TCEP, 0.4 M Morpholin, pH 8.5, 40°C.

Ligationsstelle mit hoher Selektivität entfernt werden (Abbildung 63C'). Diese Ergebnisse zeigen, dass besonders leistungsfähige Auxiliare erhalten werden, sofern die Peptidligationen über 2'-substituierte 2-Mercaptoethyl-Grundgerüste (**1e** und **1g**) vermittelt werden. Es wurde vermutet, dass der β -ständige Substituent das Thioester-verknüpfte Intermediat in ein reaktives Rotamer überführt, welches den anschließenden S \rightarrow N-Acyltransfer begünstigt. Demnach sollte dieses Grundgerüst für zukünftige N $^{\alpha}$ -Auxiliare als Leitstruktur genutzt werden. Im Gegensatz dazu sollten α -verzweigte 2-Mercapto-ethyl-basierte Grundgerüste (**1d**) oder 3-Mercapto-propyl-basierte Auxiliare (**1a-c**) vermieden werden. In diesen beiden Fällen besteht die Gefahr, dass die Anwendung der Hilfsmoleküle auf glycinhaltige Ligationsstellen beschränkt ist.

In Kapitel 4.3 wurde eine „HPLC-freie“ Methode der chemischen Proteinsynthese entwickelt. Dabei werden die gewünschten Proteine in hoher Reinheit erhalten, ohne dass es einer einzigen HPLC-Reinigung bedarf. Das Konzept basiert auf der Verwendung von zwei orthogonalen Reaktivitätsmarkierungen und dem Einsatz der Auxiliar-vermittelten Peptidligation auf der Festphase (Abbildung 64A). Die benötigten Peptidthioester werden im letzten Schritt der SPPS mit einer His₆-Einheit versehen. Damit wird ausschließlich der Volllängenpeptidthioester **152** auf dem Ni-NTA-Harz immobilisiert und auf diesem Weg von

Verunreinigungen (**153**) befreit. Die für die ENCL-Reaktion benötigten Auxiliärpeptide **155** werden als C-terminale Peptidhydrazide aufgebaut und das 2MPE-Auxiliars im letzten Schritt der SPPS eingeführt. Damit ist nur das Volllängenauxiliärpeptid **155** zur nachfolgenden Verknüpfungsreaktion mit dem gereinigten Harz-gebundenen Peptidthioester **154** befähigt. Anschließend wird das 2MPE-Auxiliar entfernt, das native Protein vom Ni-NTA-Harz freigesetzt und auf einem Aldehyd-funktionalisierten Agarose Harz (über die Hydrazid-Einheit) selektiv immobilisiert. Dabei werden Nebenprodukte der NCL-Reaktion (Hydrolyseprodukt des Peptidthioesters, **158**) entfernt. Im letzten Schritt wird die kovalente Bindung (Hydrazon in **159**) zum Agaroseharz gespalten und dabei das native Protein **160** in reiner Form freigesetzt. Diese Methode wurde erfolgreich für die Synthese von neun MUC1-Proteinen **163a-e** mit einer Länge von 46-126 Aminosäuren genutzt (Abbildung 64B/C). In allen Fällen wurden die gewünschten Zielproteine in hoher Reinheit (90-98%) erhalten. Diese Reinheit sollte für eine Vielzahl von biologischen Untersuchungen ausreichend sein. Im Vergleich zur konventionellen HPLC-basierten Proteinsynthese benötigt diese Methode deutlich weniger Zeit und Lösungsmittel. Zusätzlich kann die HPLC-freie Proteinsynthese in

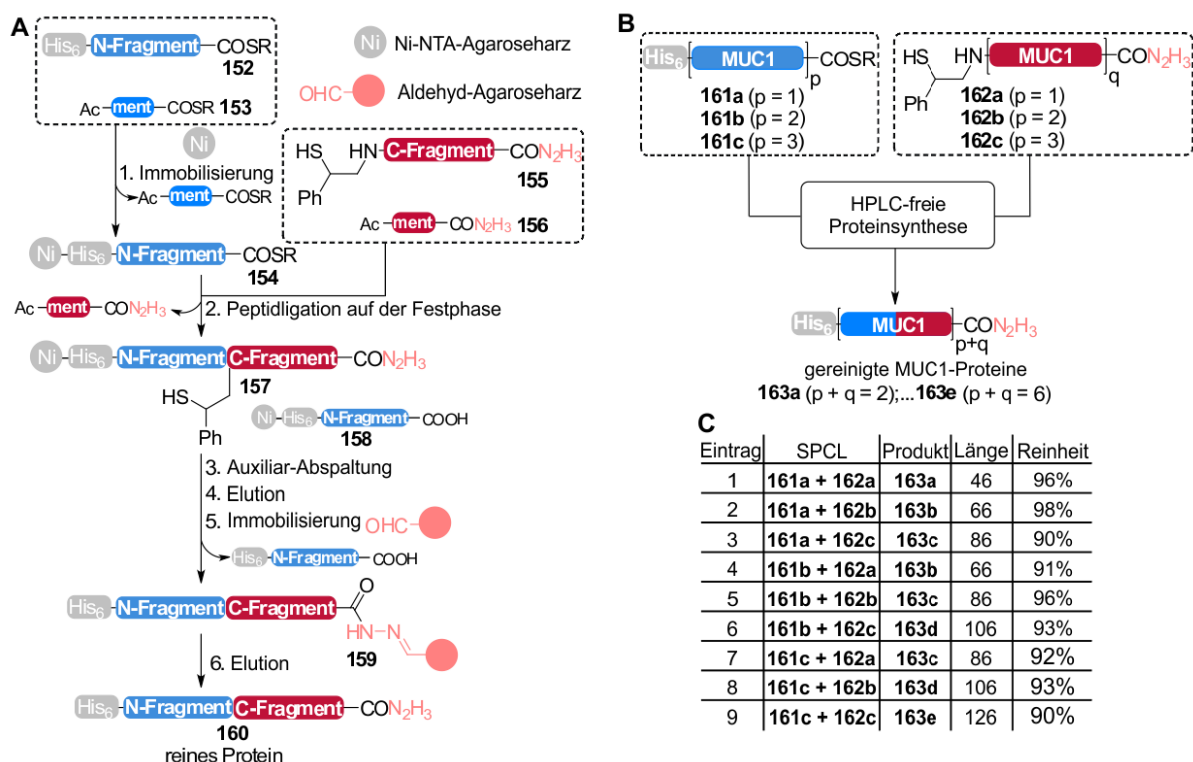


Abbildung 64: Konzept der „HPLC-freie Proteinsynthese“ (A) und dessen Anwendung für die Synthese der MUC1-Proteine **163a-e** (B). Tabellarische Übersicht (C) der durchgeführten Verknüpfungsreaktionen unter Angabe der Länge (Anzahl Aminosäuren) und Reinheit der finalen Zielproteine **163a-e**. Details siehe Kapitel 4.3; MUC1: GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH.

einem parallelen Format erfolgen und sollte sich prinzipiell in einem vollständig automatisierbaren Verfahren realisieren lassen.

Im letzten Kapitel wurde erstmals die Synthese und Anwendung eines Selenolfunktionalisierten N^α -Auxiliars für die ENCL beschrieben (Abbildung 65). Die Synthese eines generell anwendbaren Vorläufermoleküls stelle aufgrund der labilen Se-C-Bindung eine Herausforderung dar. Die Verwendung des *Se*-PMB-geschützten Phenethylamins **179** ermöglichte schließlich die Synthese des N-terminalen Glycinauxiliarpeptid **182** und damit die Untersuchung des 2SPE-Auxiliars (Abbildung 65, **1h**). Verknüpfungsreaktionen mit Peptidthioestern unter gewöhnlichen NCL-Bedingungen verliefen jedoch ohne Erfolg, da die notwendige Reduktion des Diselenids mit TCEP zur oxidativen Deselenierung des Auxiliarpeptids **182** führte. Dieses Problem konnte jedoch auf einfache Weise umgangen werden, indem auf das Prinzip der Selenocystein-Selenoester-Ligation^[46] zurückgegriffen wurde. Die Gly-Gly-Verknüpfungsreaktion zwischen dem Peptidselenoester **187** und dem 2SPE-Auxiliarpeptid **182** benötigte nur zwei Minuten und ist damit deutlich schneller als jede bisher beschriebene Auxiliar-vermittelte Peptidligation oder NCL-Reaktion. Zusätzlich wurde das 2SPE-Auxiliar in wesentlich kürzerer Zeit (45 min) als dessen Thio-Analogon (2MPE-Auxiliar: 24 h) mit hoher Selektivität (91%) entfernt. Damit beseitigt das 2SPE-Grundgerüst gleich zwei Schwachstellen des „state-of-art“ 2MPE-Auxiliars und kann daher als neuer Wegweiser auf der Suche nach einem universellen Werkzeug für die chemoselektive Peptidfragmentverknüpfung gesehen werden.

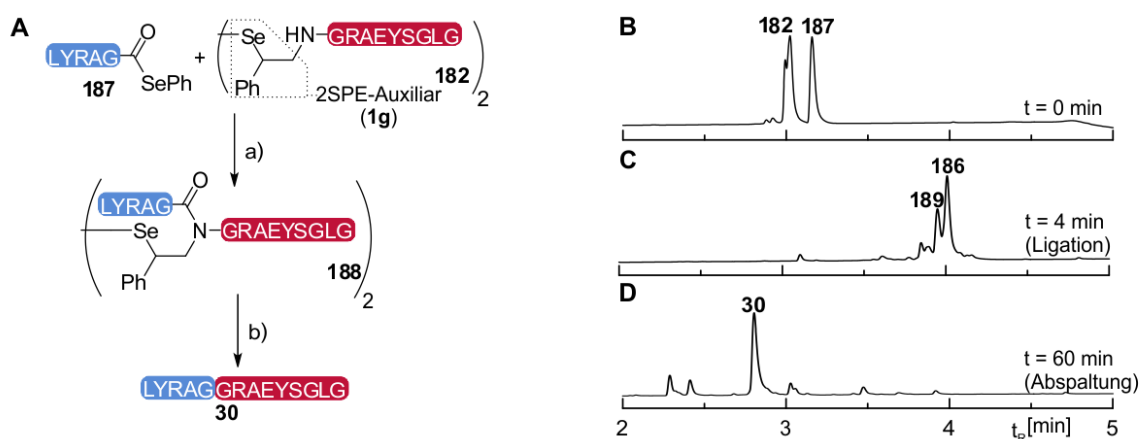


Abbildung 65: Anwendung des 2SPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): Im ersten Schritt wird der Selenoester **187** mit dem Auxiliarpeptid **182** verknüpft und anschließend das 2SPE-Auxiliar vom Ligrationsprodukt **186** abgespalten. UPLC-Analysen vor (B) und nach (C) der Ligation, sowie nach 60 Minuten (D) der Auxiliarabspaltungsreaktion. Bedingungen: a) Peptidkonzentration = 2 mM; 6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, RT, pH 6.5; b) Peptidkonzentration = 0.5 mM, 0.2 M TCEP, 0.8 M Morpholin, pH 8.5, RT.

Zum Abschluss gibt die nachfolgende Tabelle einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten N^α-Auxiliare und deren Eigenschaften in der ENCL.

Auxiliar	1a EWG:SO ₂ Ph	1b CN	1c C ₆ H ₄ NO ₂	1d	1e R: Ph	1f R	1g Me	1h
Ligation:								
Gly-Gly	Dauer: 1-2 h							Gly-Gly: 2-4 min
Ala-Gly	nicht untersucht	nicht untersucht	Dauer: ~8 h	Dauer: ~24 h	Dauer: ~4 h	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
Leu-Gly	nicht untersucht	nicht untersucht	Dauer: ~24 h	Dauer: < 24 h	Dauer: ~8 h	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
jenseits von Gly	kein S,N-Acyltransfer							
Abspaltung:								
an Gly-Gly	keine Abspaltung	geringe Selektivität	mittlere Selektivität	hohe Selektivität	hohe Selektivität	hohe Selektivität	hohe Selektivität	hohe Selektivität
jenseits von Gly	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	hohe Selektivität	geringe Selektivität	geringe Selektivität	nicht untersucht

Tabelle 1: Überblick über die untersuchten N^α-Auxiliare **1a-h** und deren Eigenschaften in der ENCL.

5.2. Ausblick

Um das volle Potential der chemischen Peptid- und Proteinsynthese zu entfalten, bedarf es einer universell anwendbaren Methode der chemoselektiven Peptidfragmentverknüpfung. Wie in dieser Arbeit gezeigt, könnte dieses Ziel in Zukunft durch hochleistungsfähige N^α-Auxiliare realisiert werden. Mit dem 2MPE-Grundgerüst steht nun eine Leitstruktur zur Verfügung, welche die Entwicklung eines universellen Werkzeuges für die Peptidligation in Zukunft weiter vorantreiben sollte. Im Fokus zukünftiger Forschungsvorhaben sollte die Verbesserung der Auxiliar-Abspaltung (Selektivität & Geschwindigkeit) und der ENCL-Reaktion (kürzere Reaktionszeiten) stehen. Ersteres könnte durch die Verwendung von Aryl-Resten gelingen, welche die Radikalintermediate (oder die finalen Reaktionsprodukte) besser stabilisieren als die Phenylgruppe des 2MPE-Auxiliars. In diesem Zusammenhang sollten para- und ortho-substituierte Arylsysteme mit elektronenschiebenden- und ziehenden funktionellen Gruppen hilfreich sein. Durch die Verwendung einer *ortho*-Nitrophenyl-Gruppe könnte eine photolabile Variante des 2MPE-Auxiliars erhalten werden. In diesem Fall müsste die Entfernung des Auxiliars auch ohne TCEP gelingen und damit die Notwendigkeit der temporären Maskierung von internen Cystein-Resten (Gefahr der Entschwefelung durch TCEP) vermieden werden. Außerdem könnte der Aryl-Rest genutzt werden, um das Auxiliar mit einer zweiten funktionellen Gruppe auszustatten. Durch ein Arylhydrazid-funktionalisiertes Hilfsmolekül könnte beispielsweise eine "spurlose HPLC-freie" Reinigung der Auxiliarpeptide ermöglicht werden, indem diese selektiv auf einen Aldehyd-Agaroseharz immobilisiert und anschließend wieder freigesetzt werden (analog Abschnitt 4.3). Diese Strategie hätte den Vorteil, dass die zur Aufreinigung verwendete Reaktivitätsmarkierung im Zuge der Auxiliar-Abspaltung entfernt wird.

Um die Reaktionsgeschwindigkeit der Auxiliar-vermittelten Peptidligation zu erhöhen, sollte der Einsatz des 2SPE-Auxiliars vorangetrieben werden. Die hohe Nukleophilie der Selenolgruppe wird auch an sterisch anspruchsvollen Verknüpfungsstellen schnellere ENCL-Reaktionen ermöglichen als Thiol-basierte N^α-Auxiliare. Zusätzlich erscheint eine selektive Entfernung des 2SPE-Auxiliar in Gegenwart von ungeschützten Cystein-Resten möglich. Allerdings muss zunächst die Synthese eines universell anwendbaren Vorläufermoleküls erarbeitet werden. Da die Se-C-Bindung des 2SPE-Grundgerüsts unter reduktiven Bedingungen labil ist, sollten in Zukunft oxidative Methoden für die Generierung der

Aldehyd-Funktion erprobt werden. Zusätzlich würde die Synthese der 2SPE-Auxiliarpeptide durch die Verwendung einer TFA-labilen Selenol-Schutzgruppe, anstelle des oxidativ spaltbaren PMB-Selenoether, erleichtert werden. In dieser Arbeit beschränkte sich die Anwendung des 2SPE-Auxiliars auf Verknüpfungsreaktionen mit Peptidselenoestern. Da die Verknüpfungsreaktionen ohne Thioladditive und externe Reduktionsmittel in wenigen Minuten erfolgen, sollte diese Strategie weiter genutzt werden. Es ist davon auszugehen, dass hochleistungsfähige N^α-Auxiliare in Zukunft eine zentrale Rolle in der chemische Peptid- und Proteinsynthese einnehmen werden.

6. Experimenteller Teil

6.1. Reagenzien und Lösungsmittel

Kommerziell verfügbare Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Chemikalien wurden von *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma Aldrich* (St. Louis, USA), *VWR Chemicals* (Darmstadt, Germany), *Acros Organics* (Geel, Belgien) oder aus Restbeständen der Humboldt-Universität zu Berlin bezogen. Kupplungsreagenzien, Aminosäurebausteine und Syntheseharze für die Festphasenpeptid-synthese wurden bei *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland), *Luxembourg Bio Technologies Ltd.* (Ness Ziona, Israel), *Carbolution Chemicals GmbH* (Saarbrücken, Deutschland), *Iris Biotech GmbH* (Marktredwitz, Deutschland), *Novabiochem* (Darmstadt, Deutschland) und *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, Deutschland) erworben. Für das Projekt der HPLC-freien Synthese von Proteinen wurden Ni-NTA beladene Agarosekügelchen der Firma *Cube Biotech* (Monheim, Deutschland) und Aldehydfunktionalisierte Agarosekügelchen von *ABT* (Madrid, Spanien) verwendet. Für die Festphasenpeptidsynthese wurde DMF der Qualitätsstufe „synthesis grade“ von *Biosolve* (Valkenswaard, Niederlande) und DMF der Qualitätsstufe „for synthesis“ von *VWR Chemicals* (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Deuterierte Lösungsmittel wurden von *DEUTERO GmbH* (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Deionisiertes/Millipore Wasser wurde durch Verwendung einer „*Milli-Q Ultra Pure Water Purification*“ Anlage von *membraPure* (Henningsdorf, Germany) erhalten. Für HPLC-basierte Reinigungen und Analysen wurde Acetonitril des Reinheitsgrades „HPLC-grade“ von *VWR Chemicals* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Wasserfreie Lösungsmittel wurden aus einer *SPS 800* Anlage von *MBraun* bezogen.

6.2. Analytische Methoden

Zur **dünnschichtchromatographischen** Analyse wurden DC-Platten 60 F_{254} der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Visualisierung wurde entweder Fluoreszenzlöschung ($\lambda = 254$ nm) oder folgende Färbereagenzien verwendet:

Kaliumpermanganat-Lösung: 5.0 g KMnO_4 und 33.0 g K_2CO_3 in 500 mL einer wässrigen 0.02% NaOH-Lösung.

Ninhydrin-Lösung: 0.2 g Ninhydrin in 100 mL Ethanol/Essigsäure (97/3, v/v).

Für die **UPLC** und **UPLC-MS** Analysen wurden *Acquity* Systeme von *Waters* (Milford, USA) eingesetzt. Für BEH130 C18 Säulen (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) wurde ein binäres Gemisch aus A (0.1% TFA, 1% ACN, 98.9% H₂O) und B (0.1% TFA, 1% H₂O, 98.9% ACN) als mobile Phase verwendet. Bei Verwendung von CSH130 C18 Säulen (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m) wurde mit einem binären Gemisch von C (0.5% TFA, 1% ACN, 98.5% H₂O) und D (0.5% TFA, 1% H₂O, 98.5% ACN) als mobile Phase gearbeitet. Die Analysen erfolgten mit einer Flussrate von 0.5 mL/min unter Verwendung linearer Gradienten. Die Temperatur des Säulen-Ofens wurde während der Analyse auf 50°C eingestellt.

Analytische HPLC-MS-Messungen wurden an einer Anlage von *Agilent* (Santa Clara, USA) der 1100 Serie durchgeführt. Die dabei verwendete *Polaris C18-A* (100 x 2 mm, 3 μ m) Säule von *Varian* (Palo Alto, USA) wurde mit einem binären Gemisch von A (0.1% Ameisensäure, 1% ACN, 98.9% H₂O) und B (0.1% Ameisensäure, 1 % H₂O, 98.9% ACN) als mobile Phase betrieben. Die Analysen erfolgten mit einer Flussrate von 0.3 mL/min unter Verwendung linearer Gradienten. Die Temperatur des Säulen-Ofens wurde während der Analyse auf 55°C eingestellt.

Maldi-TOF-Analysen erfolgten an einem *Axima Confidence* Spektrometer von *Shimadzu* (Kyoto, Japan) durch Verwendung einer CHCA-Matrix (10 mg α -Cyano-4-hydroxymtsäure suspendiert in 1 mL H₂O/ACN/TFA (1/1/0.001, v/v/v).

NMR-Spektren wurden an einem *Avance I* 600 MHz-, *Avance II* 500 MHz- und *Avance II* 300 MHz-Spektrometer von *Bruker* (Billerica, USA) gemessen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte auf das Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels.^[110] Die Werte der chemischen Verschiebung (δ) werden in *parts per million* (ppm) und die Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz (Hz) angegeben. Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), m (Multipllett).

HRMS-Spektren wurden an einem *QstarXL* Spektrometer von *Applied Biosystems* (Foster City, USA) gemessen.

6.3. Präparative Methoden

Präparative HPLC-Reinigungen erfolgten an einer Anlage von *Agilent* (Santa Clara, USA) der *1100 Serie* durch Verwendung einer *Nucleodur C18 Gravity* (250 mm x 21 mm, 5 μ m) Säule von *Macherey-Nagel* (Düren, Deutschland), welche mit einem binärem Gemisch aus A (0.1% TFA, 1% ACN, 98.9% H₂O) und B (0.1% TFA, 1% H₂O, 98.9% ACN) als mobiler Phase (Fluss 15 mL/min) betrieben wurde.

Semi-präparative HPLC-Reinigungen erfolgten an einer Anlage von *Agilent* (Santa Clara, USA) der *1100 Serie* durch Verwendung einer *Polaris C18-A* (250 x 10.0 mm) Säule von *Varian* (Palo Alto, USA), welche mit einem binärem Gemisch aus A (0.1% TFA, 1% ACN, 98.9% H₂O) und B (0.1% TFA, 1% H₂O, 98.9% ACN) als mobiler Phase (Fluss 6 mL/min) betrieben wurde.

Säulenchromatographische Reinigungen erfolgten an Kieselgel (0.060-0.2 mm, 60 Å) von *Acros Organics* (Geel, Belgien) und dem Einsatz von organischen Lösungsmittelgemischen als mobiler Phase.

6.4. Festphasenpeptidsynthese

6.4.1. Fmoc-basierte Peptidsynthese

Erstbeladung des Rink-Amid-Harzes

Das Harz (Beladung ~ 0.18 μ mol/mg) wurde in einen Spritzenreaktor überführt und zum Quellen mit DMF behandelt (10 min). Die Fmoc-Gruppe wurde durch Behandlung des Harzes mit 20 Vol.-% Piperidin in DMF (2 x 5 min) entfernt. Das Harz wurde gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF) und die Fmoc-geschützte Aminosäure (4 Äq., $c = 0.2$ M in DMF) in Gegenwart von PyBOP (4 Äq.) und DIPEA (12 Äq.) gekuppelt. Nach einer Stunde wurde das Harz gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF), mit DMF/Ac₂O/Lutidin (89/5/6, v/v/v, 5 min) behandelt und anschließend gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF). Die Fmoc-Gruppe wurde durch Behandlung des Harzes mit einer 20%igen Piperidin Lösung in DMF (2 x 5 min) entfernt und das Harz gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF). Anschließend wurde die Erstbeladung bestimmt, indem die Menge des Piperidin-Fulven Adduktes ($\lambda = 301$ nm, $\epsilon = 7800$ M⁻¹cm⁻¹) photometrisch quantifiziert wurde.

Erstbeladung von Chlorotrityl- und 2-Chlorotrityl-Harzen mit Fmoc-geschützten Aminosäuren

Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor überführt und zum Quellen mit DCM (10 min) behandelt. Die Kupplung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgte durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung des jeweiligen Fmoc-Monomers (4 Äq., $c = 0.1$ M in DCM) in Gegenwart von DIPEA (20 Äq.). Nach einer Stunde wurde das Harz mit einer 10 Vol.-% Lösung von DIPEA (50 Äq.) in MeOH behandelt (30 min). Das Harz wurde gewaschen (5 x DCM, 3x DMF), die Fmoc-Gruppe entfernt und die Erstbeladung des Harzes bestimmt (siehe oben).

Erstbeladung von Chlorotrityl-Harzen zum Aufbau von Peptidhydraziden^[107]

Das Harz wurde in einen Spritzenreaktor überführt und zum Quellen mit DMF (10 min) behandelt. Anschließend wurde das Harz mit einer Lösung von Hydrazin-Hydrat (10 Äq., $c = 0.5$ M in DMF) und NEt_3 (20 Äq.) zur Reaktion gebracht. Nach einer Stunde wurde das Harz mit einer 10 Vol.-% Lösung von DIPEA (50 Äq.) in MeOH behandelt (30 min). Das Harz wurde gewaschen (5 x DCM, 3 x DMF) und die erste Fmoc-geschützte Aminosäure (4 Äq., $c = 0.2$ M in DMF) in Gegenwart von PyBOP (4 Äq.) und DIPEA (12 Äq.) gekuppelt. Nach einer Stunde wurde das Harz gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF), die Fmoc-Gruppe entfernt und die Erstbeladung des Harzes bestimmt (siehe oben).

Automatisierte Festphasenpeptidsynthesen wurden an einem *MultiPep* RS Syntheseautomaten von *Intavis* (Köln, Deutschland) durchgeführt. Im Folgenden ist ein Standardprotokoll gegeben. Andere Protokolle sind in eigenen Veröffentlichungen beschrieben.^[53, 111]

Kupplung: Aktivierung der Fmoc-geschützten Aminosäure (4 Äq.) in Gegenwart von HCTU/OxymaPure (jeweils 4 Äq.), DIPEA (10 Äq.) in DMF (Konzentration = 0.2 M oder 0.4 M, Kupplungsdauer 15-30 min).

Waschschritt: 3 x DMF.

Capping: DMF/Ac₂O/Lutidin (89/5/6, v/v/v), 5 min.

Waschschritt: 3 x DMF.

Entschützung: 20% Piperidin in DMF; 1 x 8 min und 1x 6 min.

Waschschritt: 5 x DMF.

Reduktive Aminierung im Zuge der SPPS

Das Harz wurde in NMP gequollen (~5 min) und anschließend mit einer Lösung des Aldehyds (15 Äq.; c = 0.4 M) und NaCNBH₃ (15 Äq.; c = 0.4 M) in NMP/iPrOH/AcOH (3/1/0.05, v/v/v) behandelt (~16 h).

Abspaltung vom Polymeren Träger und Fällung der Peptide

Das Harz wurde gewaschen (10 x DCM) und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde eine Mischung (3 mL/10 µmol) von TFA/TIS (95/5, v/v) oder TFA/TIS/Wasser (95/2.5/2.5, v/v/v) zugegeben. Nach zwei Stunden wurde die Abspatlösung per Filtration vom Harz abgetrennt und das Harz mit TFA gewaschen (3 x 0.5 mL). Die vereinigten TFA-Lösungen wurden im Argon-Gegenstrom eingeeengt (auf ~1-2 mL/ 10 µmol) und durch Zugabe von Diethylether (8-10-faches Volumen) die Fällung der Peptide erreicht. Anschließend wurde die Suspension auf Trockeneis gekühlt (~1 h) und danach zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der überstehende Ether wurde dekantiert, der Rückstand gelöst (z.B.: in einem Gemisch aus Wasser/ACN/TFA (1/1/0.001, v/v/v)) und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt oder anderweitig verwendet.

Überführung von vollständig geschützten Peptidsäuren in Peptidthioester ^[94]

Im Anschluß an die Festphasenpeptidsynthese wurde der freie N-Terminus durch Behandlung (30 min) mit Boc₂O (50 Äq., c = 0.4 M) and DIPEA (10 Äq.) in DMF geschützt. Das Harz wurde gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM) und im Vakuum getrocknet. Die vollständig

geschützten Peptidsäuren wurden erhalten, indem das Harz mit einer Lösung aus DCM/2, 2, 2-Trifluorethanol/Essigsäure (8/1/1, v/v/v, 10 mL/25 μ mol) für zwei Stunden behandelt wurde. Das Harz wurde mit einer Lösung aus DCM/2, 2, 2-Trifluorethanol/Essigsäure (8/1/1, v/v/v) gewaschen (2 x 4 mL) und die vereinigten Lösungen in Hexan (50 mL) gegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Hochvakuum über Nacht getrocknet. Das Rohprodukt wurde in DMF (4 mL) gelöst, die Lösung auf -25-30°C (oder RT bei C-terminalen Gly-Rest) gekühlt und durch Zugabe von PyBOP (5 Äq.; bezogen auf die Erstbeladung des eingesetzten SPPS-Harzes), Thiol (30 Äq.) und DIPEA (5 Äq.) die Bildung des vollständig geschützten Peptidthioesters eingeleitet. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels UPLC-MS Analyse verfolgt und die Reaktion im Falle eines vollständigen Umsatzes (ca. 1-4 h) durch Zugabe von TFA (20 Äq.) gestoppt. Flüchtige Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit einer Lösung von TFA/TIS/Wasser (95/2.5/2.5, v/v/v, 8 mL/25 μ mol) für zwei Stunden behandelt. Die Lösung wurde im Argon-Gegenstrom eingengt (auf ~2 mL/ 25 μ mol) und durch Zugabe von Diethylether (8-10-faches Volumen) die Fällung der Peptide erreicht. Anschließend wurde die Suspension auf Trockeneis gekühlt (~1 h) und danach zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der überstehende Ether wurde dekantiert, der Rückstand gelöst (z.B.: in einem Gemisch aus Wasser/ACN/TFA (1/1/0.001, v/v/v)) und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt oder anderweitig verwendet.

6.4.2. Boc-basierte Peptidsynthese

Erstbeladung des MBHA-Harzes

Das Harz (Beladung ~0.18 μ mol/mg) wurde in einen Spritzenreaktor überführt, in DCM gequollen (4 min) und anschließend mit einer 10 Vol.-% DIPEA-Lösung in DCM behandelt (Neutralisation des Hydrochlorids). Das Harz wurde gewaschen (10 x DCM, 5 x DMF) und die Fmoc-geschützte Aminosäure (4 Äq., c = 0.2 M in DMF) in Gegenwart von PyBOP (4 Äq.) und DIPEA (12 Äq.) gekuppelt. Nach einer Stunde wurde das Harz gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF), mit DMF/Ac₂O/Lutidin (89/5/6, v/v/v; 5 min) behandelt und anschließend gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF). Die Fmoc-Gruppe wurde durch Behandlung des Harzes mit einer 20 Vol.-% Piperidin Lösung in DMF (2 x 5 min) entfernt, das Harz gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF) und die Erstbeladung des Harzes bestimmt. Anschließend wurde

S-Trityl-3-mercaptopropionsäure (4 Äq., $c = 0.2$ M in DMF) in Gegenwart von PyBOP (4 Äq.) und DIPEA (12 Äq.) gekuppelt, das Harz gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3x DMF), mit DMF/Ac₂O/Lutidin (89/5/6, v/v/v; 5 min) behandelt und gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Die Abspaltung der Trityl-Gruppe erfolgte durch Behandlung des Harzes mit einer Lösung von TFA/TIS (95/5, v/v/v, 2 x 5 min). Anschließend wurde das Harz gewaschen (10 x DCM, 5x DMF) und die erste Boc-geschützte Aminosäure (4 Äq., $c = 0.2$ M in DMF) in Gegenwart von PyBOP (4 Äq.) und DIPEA (12 Äq.) gekuppelt (1 h).

Manuelle Festphasenpeptidsynthese

Kupplung: Aktivierung der Boc-geschützten Aminosäure (4 Äq.) in Gegenwart von HCTU/OxymaPure (jeweils 4 Äq.), DIPEA (10 Äq.) in DMF (Konzentration = 0.2 M, Kupplungsdauer 20 min).

Waschschritt: 3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF

Capping: DMF/Ac₂O/Lutidin (89/5/6, v/v/v), 5 min.

Waschschritt: 5 x DMF, 10 x DCM.

Entschützung: TFA/*m*-Kresol (95/5, v/v), 5 min.

Waschschritt: 10 x DCM, 5 x DMF.

Abspaltung vom Polymeren Träger und Fällung der Peptide

Das Harz wurde gewaschen (10 x DCM) und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde eine Mischung (3 mL/10 µmol) von TFA/TFMSA/*m*-Kresol (16/3/1, v/v/v). Nach zwei Stunden wurde die Abspalllösung per Filtration vom Harz abgetrennt und das Harz mit TFA gewaschen (3 x 0.5 mL). Die vereinigten TFA-Lösungen wurden im Argon-Gegenstrom eingengt (auf 1-2 mL/10 µmol) und durch Zugabe von Diethylether (8-10-faches Volumen) die Fällung der Peptide erreicht. Anschließend wurde die Suspension auf Trockeneis gekühlt (~1 h) und danach zentrifugiert (4000 rpm, 15 min, 4°C). Der überstehende Ether wurde

dekantiert, der Rückstand gelöst (z.B.: in einem Gemisch aus Wasser/ACN/TFA (1/1/0.001, v/v/v)) und anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt oder anderweitig verwendet.

Konzentrationsbestimmung von Peptiden in wässrigen Lösungen

Spektroskopische Methode: Im Falle von Peptiden welche Tyr ($\epsilon_{280} = 1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)-oder Trp ($\epsilon_{280} = 5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)-Reste beinhalten ^[112] Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption ($\lambda = 280 \text{ nm}$) an einem *NanoDrop ND-1000* Spektrometer (sofern nicht anders angegeben) von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) oder an einem *Carry 100* UV-Spektrometer von *Varian* (Palo Alto, USA) unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten. Für Auxiliarpeptide wurden die folgenden molaren Extinktionskoeffizienten der Auxiliar-Gruppe verwendet:

- Phenylsulfonyl-Auxiliar **1a**: ($\epsilon_{280} = 115 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)^[87]
- Nitrobenzyl-Auxiliare **1c** und **1d**: ($\epsilon_{280} = 8700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
- 2-Mercaptophenethyl-Auxiliar: ($\epsilon_{280} = 48 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Gravimetrische Methode: Die Auswaage des gefriergetrockneten Peptids wurde ermittelt und daraus die erhaltene Stoffmenge unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes bestimmt. Anschließend wurde das Peptid in einem definierten Volumen gelöst (z.B.: in wässriger 0.1% TFA). Für die Berechnung des Molekulargewichtes wurde angenommen, dass die Reste der basischen Aminosäuren (Arg, Lys, His) und freie N-Termini der gefriergetrockneten Peptide in Form ihrer TFA-Salze vorlagen.

6.5. Standardprotokoll für Auxiliar-vermittelte Peptidligationen

Die Feststoffe (z.B. Na_2HPO_4 , GuHCl) des Ligationspuffers wurden eingewogen, Wasser (Millipore) hinzugegeben und die Lösung, unter starkem Rühren, im Vakuum von Sauerstoff befreit. Unter Argon-Schutzgasatmosphäre wurde TCEP hinzugefügt und der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von wässriger 2 M NaOH eingestellt. Die Lösung wurde wiederholt

von Luft befreit und anschließend das Thioladditiv (optional) zugegeben. Nach Gebrauch wurden die Pufferlösungen bei -80 °C gelagert und maximal zwei weitere Tage verwendet.

Für die Peptidligationen wurden zunächst die Peptide (gelöst in 0.1% TFA) vereint und anschließend gefriergetrocknet. Die Peptide wurden in Puffer gelöst und das Reaktionsgefäß durch Einleiten von Argon unter Schutzgas-Atmosphäre gesetzt. Zusätzlich wurden die Reaktionsgefäße mit Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung (Disulfidbildung) geschützt und die Reaktionslösung mit Hilfe eines Laborschüttlers durchmischt (400-800 rpm). Zur UPLC- oder HPLC-Analyse wurde 1 µL der Ligationslösung mit 29 µL wässriger 0.1% TFA versetzt, die Probe kurz durchmischt (Vortexmischer) und zentrifugiert. Im präparativen Maßstab wurden die Reaktionslösung mit wässriger 0.1% TFA oder 1% TFA versetzt (mindestens 2-faches Volumen), die Probe kurz durchmischt (Vortexmischer), zentrifugiert und anschließend durch semi-präparative HPLC gereinigt.

6.6. Standardprotokoll für Auxiliär-Abspaltungreaktionen

Abspaltung ohne TCEP: Die verwendete Base wurde in Wasser (Millipore) gelöst. Anschließend wurde das gefriergetrocknete Peptid in der zuvor hergestellten Abspaltlösung gelöst und die Reaktionslösung mit Hilfe eines Laborschüttlers bei der gewünschten Temperatur durchmischt (400-800 rpm). Zur UPLC- oder HPLC-Analyse wurden 5 µL der Lösung mit 25 µL wässriger 1% TFA versetzt, die Probe kurz durchmischt (Vortexmischer) und zentrifugiert. Im präparativen Maßstab wurden die Reaktionslösung mit wässriger 1% TFA versetzt (mindestens 1-faches Volumen), die Probe kurz durchmischt (Vortexmischer), zentrifugiert und anschließend durch semi-präparative HPLC gereinigt.

Abspaltung mit TCEP: TCEP wurde eingewogen und in Wasser (Millipore) gelöst. Anschließend wurde die entsprechende Base zugesetzt. Das gefriergetrocknete Peptid wurde in der zuvor hergestellten Abspaltlösung gelöst und die Reaktionslösung mit Hilfe eines Laborschüttlers bei der gewünschten Temperatur durchmischt (400-800 rpm). Zur UPLC- oder HPLC-Analyse wurden 5 µL der Lösung mit 25 µL wässriger 1% TFA versetzt, die Probe kurz durchmischt (Vortexmischer) und zentrifugiert. Im präparativen Maßstab wurden die Reaktionslösung mit wässriger 1% TFA versetzt (mindestens 1-faches Volumen), die Probe

kurz durchmischt (Vortexmischer), zentrifugiert und anschließend durch semi-präparative HPLC gereinigt.

6.7. Synthese der Modelpeptidthioester

Die folgenden Peptidthioester wurden an einem MBHA-Harz nach der Boc-SPPS aufgebaut (Kapitel 6.4.2):

22G: UPLC-MS: $t_R = 1.7$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 723.5$ ((M+H)⁺, ber.: 723.4), 362.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 362.2); Summenformel: C₃₁H₅₀N₁₀O₈S (MW = 722.9 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-30% B in 30 min; Synthesemaßstab: 25.0 µmol; Ausbeute: 11.7 µmol (47%, A₂₈₀ = 0.50, V = 3.0 mL).

22A: UPLC-MS: $t_R = 1.6$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 737.4$ ((M+H)⁺, ber.: 737.4), 369.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 369.2); Summenformel: C₃₂H₅₂N₁₀O₈S (MW = 736.9 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-30% B in 30 min; Synthesemaßstab: 25 µmol; Ausbeute: 7.9 µmol (32%, A₂₈₀ = 0.33, V = 3.0 mL).

22L: UPLC-MS: $t_R = 1.9$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 779.5$ ((M+H)⁺, ber.: 779.4), 390.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 390.2); Summenformel: C₃₅H₅₈N₁₀O₈S (MW = 779.0 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-30% B in 30 min; Synthesemaßstab: 7.1 µmol; Ausbeute: 2.2 µmol (31%, A₂₈₀ = 0.28, V = 1.0 mL).

22H: UPLC-MS: $t_R = 1.6$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 803.5$ ((M+H)⁺, ber.: 803.4), 402.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 402.2); präparative HPLC-Reinigung: 3-30% B in 30 min; Summenformel: C₃₅H₅₄N₁₂O₈S (MW = 802.9 g·mol⁻¹); Synthesemaßstab: 10.0 µmol; Ausbeute: 4.4 µmol (44%, A₂₈₀ = 0.56, V = 1.0 mL).

22S: UPLC-MS: $t_R = 0.9$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 753.4$ ((M+H)⁺, ber.: 753.4), 377.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 377.2); Summenformel: C₃₂H₅₂N₁₀O₉S (MW = 752.8 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-30% B in 30 min; Synthesemaßstab: 10.0 µmol; Ausbeute: 2.8 µmol (28%, A₂₈₀ = 0.36, V = 1.0 mL).

22V: UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 765.5$ ((M+H)⁺, ber.: 765.4), 383.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 383.2); Summenformel: C₃₄H₅₆N₁₀O₈S (MW = 764.9 g·mol⁻¹); präparative HPLC-

Reinigung: 3-30% B in 30 min; Synthesemaßstab: 25.0 μmol ; Ausbeute: 9.6 μmol (38%, $A_{280} = 0.41$, $V = 3.0 \text{ mL}$).

22Q: UPLC-MS: $t_R = 1.6 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); m/z : 794.5 ((M+H)⁺, ber.: 794.4), 397.9 ((M+2H)²⁺, ber.: 397.7); Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{55}\text{N}_{11}\text{O}_9\text{S}$ (MW: 793.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-30% B in 30 min; Synthesemaßstab: 25.0 μmol ; Ausbeute: 7.8 μmol (31%, $A_{280} = 0.33$, $V = 3.0 \text{ mL}$).

22F: UPLC-MS: $t_R = 2.7 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); m/z : 813.5 ((M+H)⁺, ber.: 813.4), 407.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 407.2); Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}$ (MW: 813.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 10.0 μmol ; Ausbeute: 2.8 μmol (28%, $A_{280} = 0.36$, $V = 1.0 \text{ mL}$).

Peptidthioester-Synthese nach Fmoc-Strategie

Die Peptide wurden an einem 2-Chlorotrityl-Harz nach der Fmoc-basierten SPPS aufgebaut, als vollständig geschützte Peptidsäuren vom Harz abgespalten und anschließend in die Peptidthioester überführt (siehe Kapitel 6.4.1):

22L_{Aryl}: UPLC-MS: $t_R = 2.3 \text{ min}$ (3-60% B in 2 min); $m/z = 727.5$ ((M+H)⁺, ber.: 727.4), 364.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 364.2); Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}$ (MW = 726.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-60% B in 30 min; Synthesemaßstab: 5.8 μmol ; Ausbeute : 2.6 μmol , (45%, $A_{280} = 0.33$, $V = 1.0 \text{ mL}$).

22F_{Aryl}: UPLC-MS: $t_R = 2.2 \text{ min}$ (3-60% B in 2 min); $m/z = 761.4$ ((M+H)⁺, ber.: 761.4), 381.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 381.2); Summenformel: $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}$ (MW = 760.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-60% B in 30 min; Synthesemaßstab: 6.3 μmol ; Ausbeute : 0.5 μmol (8%, $A_{280} = 0.13$, $V = 0.5 \text{ mL}$).

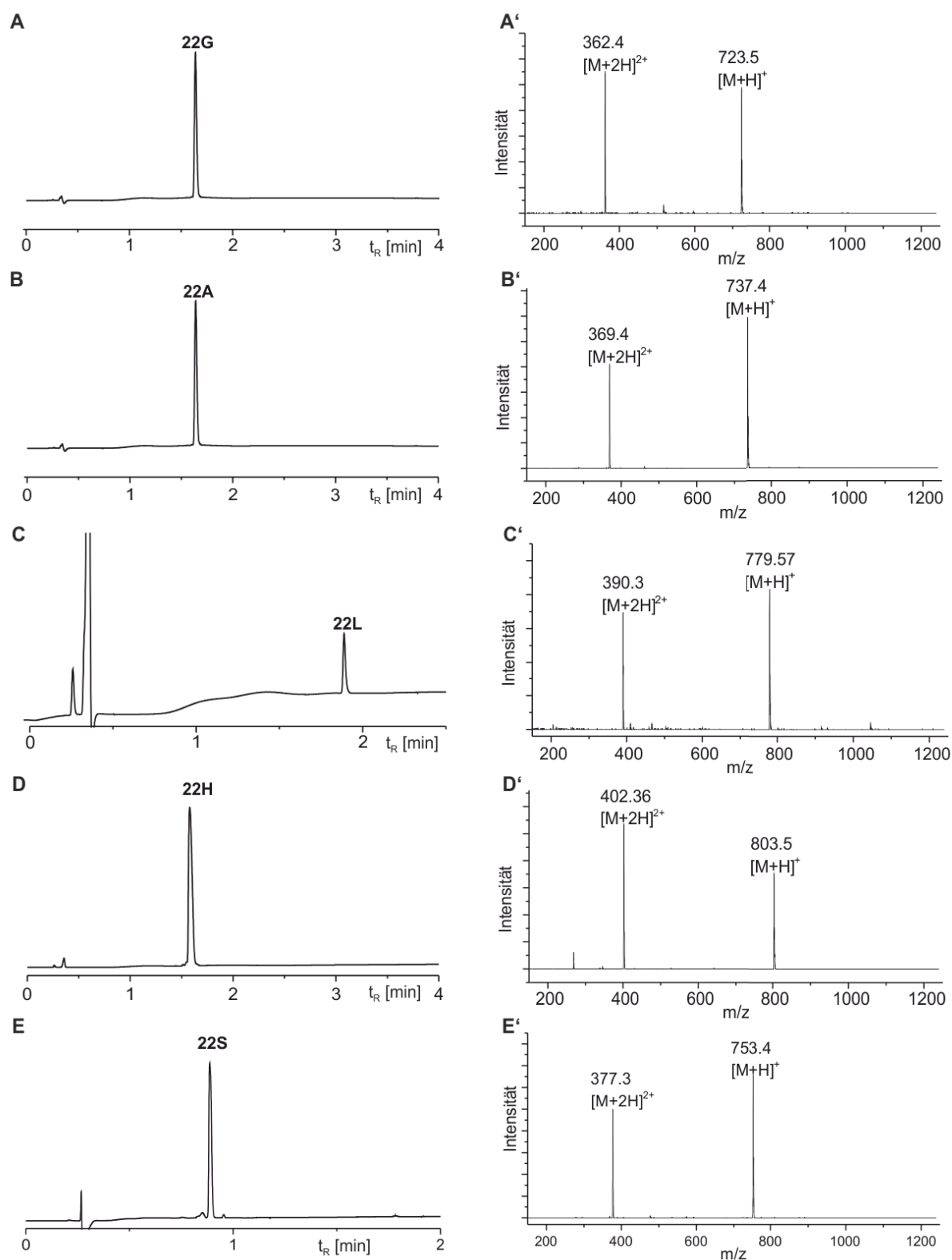


Abbildung 66: UPLC-(A-E) und ESI-MS-Analysen (A'-E') der gereinigten Peptidthioester.

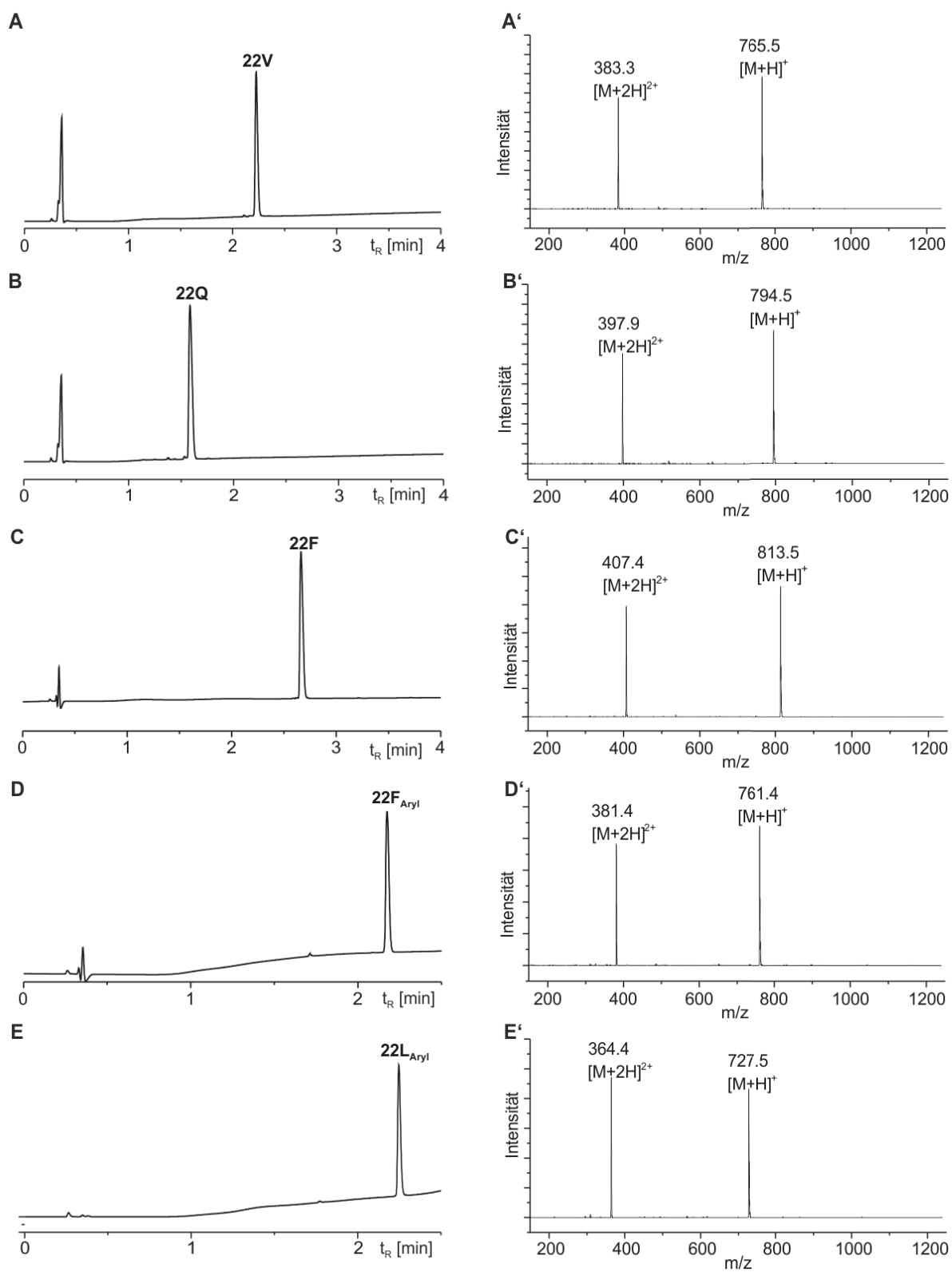


Abbildung 67: UPLC-(A-E) und ESI-MS-Analysen (A'-E') der gereinigten Peptidthioester.

6.8. Synthese und Anwendung der 6-ringbildenden Auxiliare

6.8.1. Synthese der Auxiliar-Glycin-Konjugate

Amin 13a

Bei 0°C wurde eine Lösung der Dichloroverbindung^[75] **11** (265 mg, 1.04 mmol) in THF (5 mL) mit DIPEA (177 µL, 131 mg, 1.02 mmol) versetzt. Nach 5 Min wurde das Reaktionsgemisch zu einer Lösung von Glycin-*tert*-butylester-Hydrochlorid (510 mg, 3.04 mmol) und DIPEA (518 µL, 384 mg, 2.97 mmol) in THF (10 mL) hinzugeben. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM/Wasser (2/1, v/v; 25 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und abschließend unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 2/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (151 mg, 0.49 mmol, 47%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.62 (m, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1.0 Hz, 2H), 7.52 (m, *J*₁ = 7.5 Hz, *J*₂ = 1.0 Hz, 2H), 6.43 (s, 1H), 6.01 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H) 3.45 (s, 2H) 3.13 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 1.85 (s, 1H), 1.41 (d, *J* = 1.5 Hz, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.0, 148.6, 139.1, 133.6, 129.3, 129.2, 128.20, 128.1, 125.0, 81.4, 50.3, 47.6, 28.1.

HRMS (ESI): *m/z* = 312.1263 (C₁₅H₂₂NO₄S (M+H)⁺, ber.: 312.1270); C₁₅H₂₁NO₄S (MW = 311.39 g·mol⁻¹).

*t*Bu-S-Thioether 14a^[77]

Aus dem Forschungsbericht^[77] von M. Sc. Sebastian Brühl:

In einem 10 mL-Rundkolben wurde das *tert*-Butyl-Glycin-substituierte Propen (Anmerkung: **13a**) (714 mg, 2.29 mmol) unter Argonatmosphäre mit *tert*-Butyl-Mercaptan (517 µL, 4.58 mmol) und TBAF (145 mg, 458 mmol) versetzt. Der Kolben wurde abgedunkelt und die Reaktionslösung für 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, der Rückstand säulenchromatographisch mit

Cyclohexan/Essigsäureethylester (2:1) gereinigt und das Produkt **10** als gelbes Öl (403 mg, 1.00 mmol, 44%) isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.99 – 7.90 (m, 2H, Ar), 7.71 – 7.63 (m, 1H, 10-H), 7.62 – 7.54 (m, 2H, Ar), 3.26 (d, J = 1.6 Hz, 2H, 2-H), 3.25-3.18 (m, 1H, 5-H), 3.09 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4-H'), 3.08 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 4-H''), 2.93 (dd, J = 13.1, 3.0 Hz, 1H, 6-H'), 2.70 (dd, J = 13.1, 10.8 Hz, 1H, 6-H''), 2.22 (br. s, 1H, 3-H), 1.45 (s, 9H, 1-H), 1.21 (s, 9H, 7-H).

ESI-MS (m/z): für $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_1\text{O}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 402.2; gef.: 402.2.

Auxiliar-Glycin-Konjugat **15a** ^[77]

Aus dem Forschungsbericht^[77] von M. Sc. Sebastian Brühl^[77]:

Das Glycinderivat (Anmerkung: **14a**) (403 mg, 1.00 mmol) wurde mit einer Lösung von TFA/TIS (95:5, 2 mL) in Dichlormethan (2 mL) versetzt und 90 min gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit Toluol (3 x 100 mL) coevaporiert. Anschließend wurde eine Lösung von 4 M Salzsäure (500 μL , 2.00 mmol) in Dioxan (2 mL) hinzugefügt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt **2** in reiner Form als weißer, kristalliner Feststoff erhalten. Es wurde ein quantitativer Umsatz angenommen und das Produkt direkt weiter umgesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.09 – 8.01 (m, 2H, 11-H), 7.84 (mc, 1H, 12-H), 7.73 (t, J = 7.8 Hz, 2H, 11-H), 4.20 (tt, J = 8.6, 4.5 Hz, 1H, 5-H), 3.95 (s, 2H, 2-H), 3.58 (dd, J = 14.0, 7.9 Hz, 1H, 4-H'), 3.40 (dd, J = 14.0, 4.7 Hz, 1H, 4-H''), 2.76 (dd, J = 14.2, 4.4 Hz, 1H, 6-H'), 2.62 (dd, J = 14.2, 8.7 Hz, 1H, 6-H''), 1.10 (s, 9H, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 167.7 (C-1), 135.8 (C-9), 134.9 (C-12), 129.7 (C-11), 129.0 (C-10), 61.0 (C-5), 48.22 (C-2), 44.50 (C-4), 43.0 (C-7), 30.21 (C-8), 25.54 (C-6).

ESI-MS (m/z): für $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_1\text{O}_4\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber.: 346.1; gef.: 346.2.

Amin 13b

Zu einer Lösung des Allylchlorids^[78] **12b** (147 mg, 1.44 mmol) in THF (10 mL) wurde Glycintert-butylester-Hydrochlorid (730 mg, 4.35 mmol) und DIPEA (830 µl, 1.11 g, 4.89 mmol) hinzugeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM/Wasser (2/1, v/v; 25 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase mit DCM (10 mL) ein weiteres Mal extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und abschließend unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 2/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (234 mg, 1.19 mmol, 83%) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.90-5.88 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 3.38-3.87 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 3.22-3.21 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 1.83 (s, 1H), 1.40 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.1, 130.9, 122.0, 118.0, 81.5, 51.4, 50.2, 28.00.

HRMS (ESI): *m/z* = 197.1284 (C₁₀H₁₇N₂O₂ (M+H)⁺, ber.: 197.1290); C₁₀H₁₆N₂O₂ (MW = 196.24 g·mol⁻¹).

Thioether 14b

Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde der Michael-Akzeptor **13b** (1.10 g, 5.60 mmol) mit *tert*-Butylmercaptan (1.26 mL, 1.01 g, 11.2 mmol) und einer katalytischen Menge TBAF·3H₂O (346 mg, 1.1 mmol) versetzt und das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Flüchtige Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 2/1, v/v). Dabei wurde das gewünschte Produkt (1.58 g, 5.50 mmol, 98%) als farbloses Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.33 (s, 2H), 2.94-2.92 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 2.85-2.78 (m, 3H), 1.85 (s, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.32 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.3, 120.4, 81.6, 51.6, 49.8, 43.1, 34.1, 30.9, 28.1, 28.00.

ESI-MS: *m/z* = 287.30 (C₁₄H₂₇N₂O₂S (M+H)⁺, ber.: 287.18); C₁₄H₂₆N₂O₂S (MW = 286.43 g·mol⁻¹).

Auxiliar-Glycin-Konjugat 15b

Der Ester **14b** (1.00 g, 3.49 mmol) wurde in 4 M HCl in Dioxan (5 mL) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Flüchtige Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol koevaporiert (3 x 5 mL) at = 2/1, v/v). Dabei wurde das gewünschte Produkt (0.99 g, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 4.02 (s, 2H), 3.51-3.43 (m, 3H), 2.99-2.91 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CD_3OD): δ = 168.6, 119.3, 85.7, 44.4, 32.1, 31.2, 29.2.

ESI-MS: m/z = 231.17 ($\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, ber.: 231.12); $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{SCl}$ ($\text{MW}_{\text{Hydrochlorid}}$ = 266.79 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Tertiäres Amin 17c

4-Nitrophenyllessigsäure (10.0 g, 55.2 mmol) und Paraformaldehyd (4.01 g, 132 mmol) wurden in Toluol (25 mL) gelöst und die Suspension mit Morpholin (4.8 mL, 4.75 g, 55.6 mmol) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde erhitzt (90°C, 1 h \rightarrow 100°C, 4 h) und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (50 mL) aufgenommen, mit Wasser (2 x 25 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 3/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (6.34 g, 25.6 mmol, 47%) als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.18-8.16 (dd, J_1 = 9.0 Hz, J_2 = 0.5 Hz, 2H), 7.71-7.68 (m, J_1 = 9.0 Hz, J_2 = 2.5 Hz, 2H) 5.64 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 5.41 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 3.66-3.64 (t, J = 4.5 Hz, 4H), 3.35 (d, J = 0.5 Hz, 2H), 2.46-2.45 (t, J = 4.5 Hz, 4H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 146.7, 142.4, 127.3, 123.6, 119.3, 67.1, 63.5, 53.5.

HRMS (ESI): m/z = 249.1235 ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_5\text{S}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, ber.: 249.1239); $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$ (MW = 248.28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Allylchlorid 12c

Das tertiäre Amin **17c** (2.85 g, 11.5 mmol) wurde in Toluol (5 mL) gelöst und anschließend Chlorameisensäureisobutylester (1.8 mL, 1.89 g, 13.8 mmol) zutropft. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 3/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (1.73 g, 8.77 mmol, 76%) als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.17-8.15 (dd, J_1 = 8.5 Hz, J_2 = 1.0 Hz, 2H), 7.62-7.60 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.69 (s, 1H), 5.62 (s, 1H), 4.48-4.47 (d, J = 0.5 Hz, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 147.4, 144.0, 142.3, 127.0, 123.7, 120.3, 45.9.

HRMS (ESI): m/z = 220.0138 ($\text{C}_9\text{H}_8\text{ClINO}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, ber.: 220.0141); $\text{C}_9\text{H}_8\text{ClINO}_2$ (MW = 197.62 g·mol $^{-1}$).

Sekundäres Amin 13c

Zu einer Lösung des Allylchlorids **12c** (435 mg, 2.20 mmol) in DCM (10 mL) wurde Glycin-*tert*-butylester Hydrochlorid (1.11 g, 6.60 mmol) und DIPEA (1.13 mL, 1.50 g, 11.7 mmol) hinzugeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wurde mit Wasser (2 x 10 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und abschließend unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (555 mg, 1.90 mmol, 86%) als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.19-8.16 (dt, J_1 = 9.0 Hz, J_2 = 2.5 Hz, 2H), 7.65-7.62 (dt, J_1 = 9.0 Hz, J_2 = 2.5 Hz, 2H), 5.57 (s, 1H), 5.44 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 3.68 (d, J = 1.0 Hz, 2H), 3.30 (s, 2H), 1.77 (s, 1H), 1.46 (s, 9H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.7, 147.3, 146.4, 144.4, 127.1, 123.8, 117.6, 81.5, 52.9, 50.8, 28.2.

HRMS (ESI): $m/z = 293.1496$ ($C_{15}H_{21}N_2O_4$ ($M+H$)⁺, ber.: 293.1501); $C_{15}H_{20}N_2O_4$ (MW = 292.33 g·mol⁻¹).

Thioether 14c

Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde der Michael-Akzeptor **13c** (494 mg, 1.69 mmol) mit *tert*-Butylmercaptan (238 µL, 190 mg, 2.11 mmol) und einer katalytischen Menge TBAF·3H₂O (27 mg, 0.09 mmol) versetzt und das Reaktionsgemisch 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Flüchtige Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4/1, v/v). Dabei wurde das gewünschte Produkt (508 mg, 1.34 mmol, 79%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.18-8.16 (d, $J = 3.5$ Hz, 2H), 7.41-7.39 (d, $J = 3.5$ Hz, 2H), 3.27-3.19 (dd, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 6.5$ Hz, 2H), 3.10-3.04 (m, 2H), 2.98-2.94 (m, 2H), 2.91-2.87 (m, 2H), 2.76-2.72 (m, 2H), 1.51 (s, 1H), 1.42 (s, 9H), 1.25 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.5, 150.4, 147.0, 128.8, 123.9, 81.4, 54.0, 51.8, 46.9, 42.5, 32.3, 30.9, 28.2.

HRMS (ESI): $m/z = 383.1998$ ($C_{19}H_{31}N_2O_4S$ ($M+H$)⁺, ber.: 383.2005); $C_{19}H_{30}N_2O_4S$ (MW = 382.52 g·mol⁻¹).

Auxiliar-Glycin-Konjugat 15c

Der Ester **14c** (2.40 g, 6.27 mmol) wurde in 4 M HCl in Dioxan (5 mL) gelöst und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Flüchtige Bestandteile wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Toluol koevaporiert (3 × 5 mL). Dabei wurde das gewünschte Produkt (2.25 g, 6.20 mmol, 99%) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.28-8.26 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.63-7.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.88-3.80 (m, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz, 2H), 3.63-3.50 (m, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, 2H), 3.41-3.35 (m, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.01-2.86 (m, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, 2H), 1.29 (s, 9H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CD_3OD): δ = 168.9, 149.2, 148.1, 130.6, 125.1, 52.7, 45.1, 43.6, 33.2, 31.2.

HRMS (ESI): m/z = 327.1374 ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, ber.: 327.1379); $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$ (MW = 362.87 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

6.8.2. Synthese der 6-ringbildenden Auxiliärpeptide

Die Peptide wurden an einem Rink-Amid-Harz nach der Fmoc-SPPS aufgebaut (Kapitel 6.4.1) und die Auxiliäre durch Kupplung der Auxiliär-Glycin-Monomere **15a-c** eingeführt. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten (Kapitel 6.4.1), die Thiolfunktion (*t*Bu-Thioether) deblockiert und die Auxiliärpeptide mit Hilfe der präparativen HPLC gereinigt.

Kupplung der Auxiliär-Glycin-Konjugate: Die Auxiliär-Glycin-Konjugate **15a-c** (6 Äq.) wurden in DMF gelöst ($c = 0.4 \text{ M}$ in DMF) und durch Zugabe von PyBOP (6 Äq.) und DIPEA (18 Äq.) aktiviert. Die Lösung wurde auf das Harz-gebundene Peptid gegeben. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgetrennt und das Harz gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM).

Deblockierung der Thiolfunktion:

Variante A: Die *S*-*t*Bu-geschützten Auxiliärpeptide wurden in einer TFA/TFMSA/Anisol-Lösung (8/1/1, v/v/v) bei 0°C gelöst (2 mL für 25 μmol Rohprodukt). Nach 30 min wurde die Lösung eingeeengt (~1 mL) und die Auxiliärpeptide in Diethylether gefällt (Kapitel 6.4).

Variante B: Die *S*-*t*Bu-geschützten Auxiliärpeptide wurden in TFA gelöst (2 mL für 25 μmol Rohprodukt) und die Lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde HgOAc_2 (2 – 10 Äq.) zugegeben und die Lösung bei 0°C geschüttelt. Nach 30 min wurde DTT (2 Äq. bezogen auf HgOAc_2) hinzugegeben und die Lösung 10 min geschüttelt. Anschließend wurde Lösung zentrifugiert und die TFA-Lösung abgetrennt. Der Rückstand wurde mit TFA (3 x 500 μL) gewaschen. Dazu wurde der Rückstand in TFA suspendiert, die Lösung zentrifugiert und anschließend die TFA-Lösung abgetrennt. Die vereinigten TFA-Lösungen wurden filtriert und anschließend eingeeengt (~1 mL). Anschließend wurden die Auxiliärpeptide in Diethylether gefällt (Kapitel 6.4).

20a: UPLC-MS: t_R = 3.26 min (3-40% B in 4 min); 1122.6 ((M+H)⁺, ber.: 1122.5), 562.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 561.7); Summenformel: C₄₇H₇₁N₁₃O₁₅S₂; MW: 1122.27 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 10.0 µmol; Ausbeute: 2.6 µmol (26%; A₂₈₀ = 0.25, V_{Probe} = 2 mL). *Anmerkung: Deblockierung der Thiolfunktion nach Variante A.*

20b: UPLC-MS: t_R = 2.19 min (3-40% B in 4 min); 1007.6 ((M+H)⁺, ber.: 1007.5), 504.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 504.2); Summenformel: C₄₂H₆₆N₁₄O₁₃S; MW: 1007.12 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 8.0 µmol; Ausbeute: 2.5 µmol (31%; A₂₈₀ = 0.16, V_{Probe} = 2 mL). *Anmerkung: Deblockierung der Thiolfunktion nach Variante B mit 2 Äq. HgOAc₂.*

20c: UPLC: t_R = 1.78 min (3-40% B in 2 min); ESI-MS: 1103.5 ((M+H)⁺, ber.: 1103.5), 552.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 552.3); Summenformel: C₄₇H₇₀N₁₄O₁₅S; MW = 1103.20 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 6.3 µmol; Ausbeute: 1.4 µmol (22%; A₂₈₀ = 0.69, V_{Probe} = 2 mL). *Anmerkung: Deblockierung der Thiolfunktion nach Variante A.*

45: UPLC-MS: t_R = 1.48 min (3-60% B in 4 min); 1227.5 ((M+H)⁺, ber.: 1227.5), 614.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 614.3); Summenformel: C₅₇H₇₄N₁₄O₁₅S; MW: 1227.35 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-60% B in 30 min; Synthesemaßstab: 8.2 µmol; Ausbeute: 1.52 µmol (19%; A₂₈₀ = 0.38, V_{Probe} = 4 mL). *Anmerkung: Deblockierung der Thiolfunktion nach Variante A.*

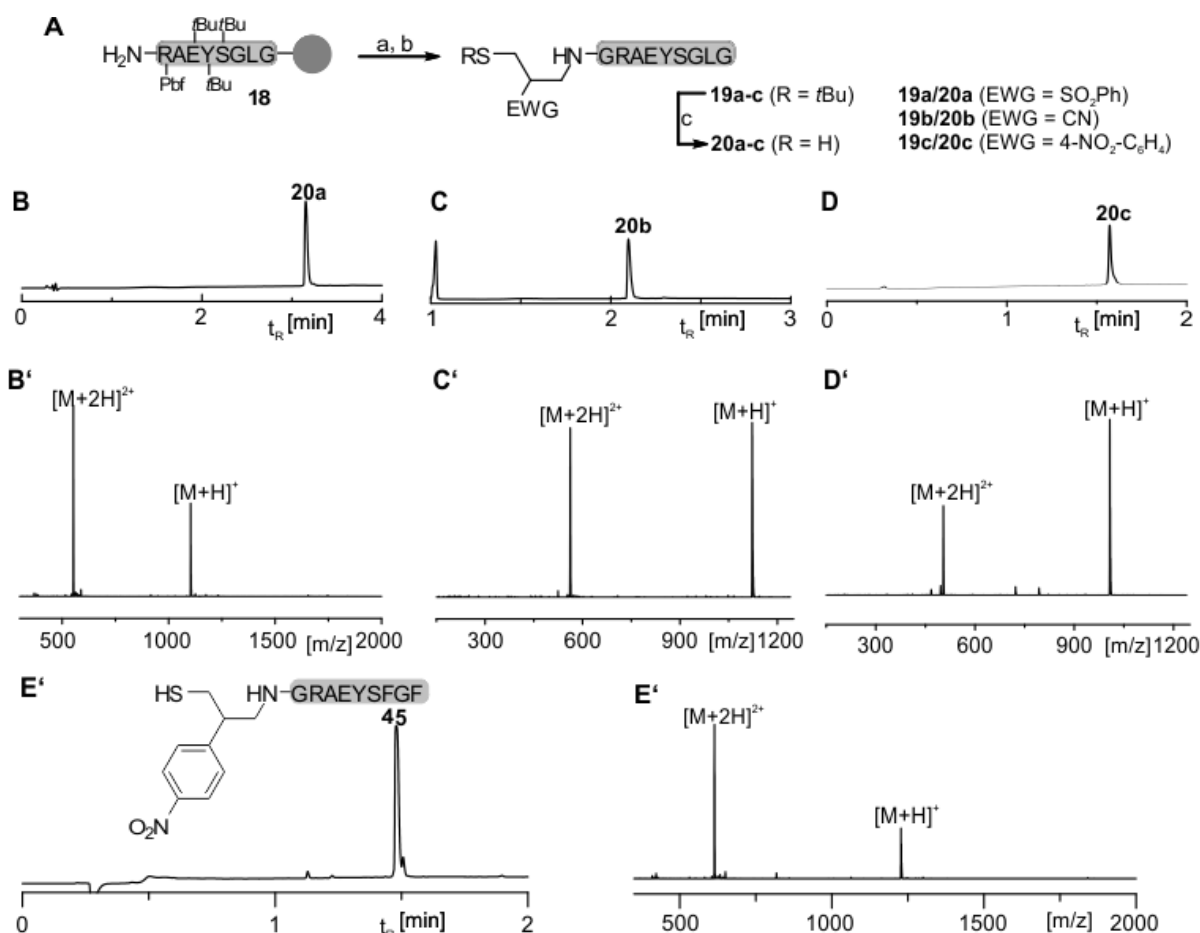


Abbildung 68: Synthese der 2-elektronenakzeptorsubstituierten 3-Mercaptopropyl-Auxiliärpeptide **20a-c** (A): UPLC-(B-E) und ESI-MS Analysen (B'-E') der gereinigten Auxiliärpeptide **20a-c**. Bedingungen: a) **15a-c**, PyBOP, DIPEA, DMF, RT; b) TFA/TIS/Wasser (95/2.5/2.5, v/v/v); c) für **19a/19c**: TFMSA/TFA/Anisol (8/1/1, v/v/v), 0°C; für **19b**: Hg(OAc)₂ (2 Äq.) in TFA, 0°C, dann DTT (4 Äq.).

6.8.3. Synthese der 6-Ring-Auxiliar-modifizierten Ligationsprodukte

Die Synthese der Ligationsprodukte **23a-c** erfolgte wie in Kapitel 6.5 beschrieben: Für die ENCL-Reaktion wurden die Auxiliärpeptide **20a-c** mit dem Peptidthioester **22G** (1-1.2 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2.5-5 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS verfolgt und anschließend die Ligationsprodukte **23a-c** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

23a: UPLC-MS: t_R = 3.1 min (3-40% B in 4 min); 842.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 841.9), 561.9 ((M+3H)³⁺, ber.: 561.6); Summenformel: C₇₃H₁₁₁N₂₁O₂₁S₂; MW: 1682.92 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 1.00 µmol; Ausbeute: 0.66 µmol (66%; A₂₈₀ =

0.36, $V_{\text{Probe}} = 0.5 \text{ mL}$). *Anmerkung: Reaktion von 19a (1.0 μmol) mit 22G (1.0 μmol); $c(19a) = 2.5 \text{ mM}$; Reaktionszeit: 2 h.*

23b: UPLC-MS: $t_R = 2.3 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); 784.5 ((M+2H) $^{2+}$, ber.: 784.4), 523.5 ((M+3H) $^{3+}$, ber.: 523.3); Summenformel: $\text{C}_{68}\text{H}_{106}\text{N}_{22}\text{O}_{19}\text{S}$; MW: 1567.77 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 2.00 μmol ; Ausbeute: 0.66 μmol (33%; $A_{280} = 0.17$, $V_{\text{Probe}} = 1 \text{ mL}$). *Anmerkung: Reaktion von 19b (2.0 μmol) mit 22G (2.2 μmol); $c(19b) = 4 \text{ mM}$; Reaktionszeit: 2 h.*

23c: UPLC: $t_R = 3.1 \text{ min}$ (3-40% B in 2 min); ESI-MS: 833.1 ((M+2H) $^{2+}$, ber.: 832.4), 555.5 ((M+3H) $^{3+}$, ber.: 555.4); Summenformel: $\text{C}_{73}\text{H}_{110}\text{N}_{22}\text{O}_{21}\text{S}$; MW: 1663.85 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 2.3 μmol ; Ausbeute: 1.55 μmol (67%; $A_{280} = 0.35$, $V_{\text{Probe}} = 5.0 \text{ mL}$). *Anmerkung: Reaktion von 19c (2.3 μmol) mit 22G (2.3 μmol); $c(19c) = 3 \text{ mM}$; Reaktionszeit: 2 h.*

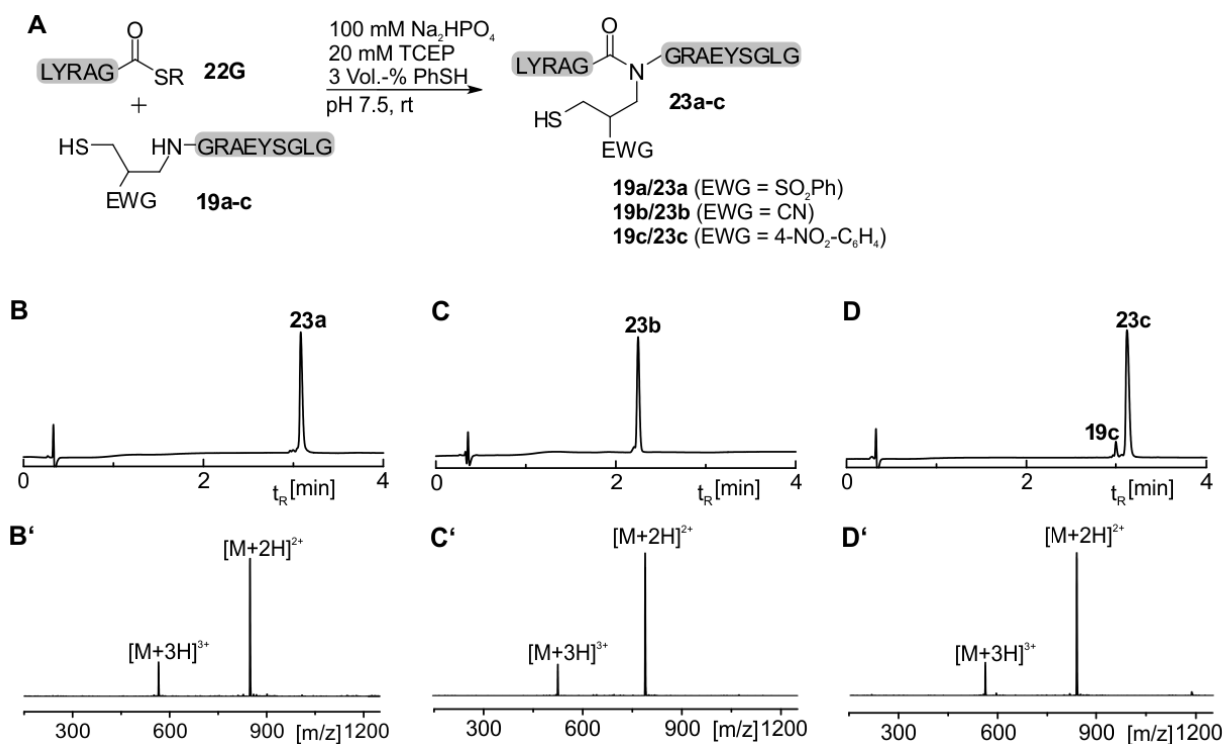


Abbildung 69: Synthese der Ligationsprodukte **23a-c** (A); UPLC-(B-D) und ESI-MS-Analysen (B'-D') der gereinigten Ligationsprodukte **23a-c**.

6.8.4. Abspaltung des 6-Ring Nitrophenyl-Auxiliars im präparativen Maßstab

Die Durchführung der Auxiliar-Abspaltung erfolgte wie in Kapitel 6.6 beschrieben: Das Ligationsprodukt **23c** wurde in einer wässrigen Lösung von TCEP (20 mM) und Morpholin (140 mM) gelöst (Peptidkonzentration 0.5 mM) und das Reaktionsgemisch bei der angegebenen Temperatur (30-70°C) geschüttelt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS verfolgt und anschließend das native Peptid **30** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

30 (Auxiliar-Abspaltung bei 25°C; Reaktionszeit: 48 h): UPLC: t_R = 2.06 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1468.7 ((M+H)⁺, ber.: 1468.8), 735.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9); 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉; MW: 1468.61 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 78 nmol (41% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.124 (5.5-fach verdünnt), V_{Probe} = 300 µL; UV-Spektrometer).

30 (Auxiliar-Abspaltung bei 30°C; Reaktionszeit: 48 h): UPLC: t_R = 2.06 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1468.7 ((M+H)⁺, ber.: 1468.8), 735.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9); 490.4 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉; MW: 1468.61 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 85 nmol (46% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.145 (5-fach verdünnt), V_{Probe} = 300 µL; UV-Spektrometer).

30 (Auxiliar-Abspaltung bei 40°C; Reaktionszeit: 16 h): UPLC: t_R = 2.06 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1468.7 ((M+H)⁺, ber.: 1468.8), 735.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9); 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉; MW: 1468.61 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 83 nmol (45% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.275, V_{Probe} = 770 µL; UV-Spektrometer).

30 (Auxiliar-Abspaltung bei 50°C; Reaktionszeit: 16 h): UPLC: t_R = 2.06 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1468.7 ((M+H)⁺, ber.: 1468.8), 735.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9); 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉; MW: 1468.61 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 67 nmol (36% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.223, V_{Probe} = 770 µL).

30 (Auxiliar-Abspaltung bei 60°C; Reaktionszeit: 16 h): UPLC: t_R = 1.86 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1468.6 ((M+H)⁺, ber.: 1468.8), 735.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9); 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3);

Summenformel: $C_{64}H_{101}N_{21}O_{19}$; MW: 1468.61 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 65 nmol (35% (14 nmol für Analyse); $A_{280} = 0.216$, $V_{\text{Probe}} = 770 \mu\text{L}$; UV-Spektrometer).

30 (Auxiliar-Abspaltung bei 70°C; Reaktionszeit: 16 h): UPLC: $t_R = 1.86 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1468.6 ($[M+H]^+$, ber.: 1468.8), 735.0 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 734.9); 490.5 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 490.3); Summenformel: $C_{64}H_{101}N_{21}O_{19}$; MW: 1468.61 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 55 nmol (30% (14 nmol für Analyse); $A_{280} = 0.183$, $V_{\text{Probe}} = 770 \mu\text{L}$; 14 nmol für Analyse).

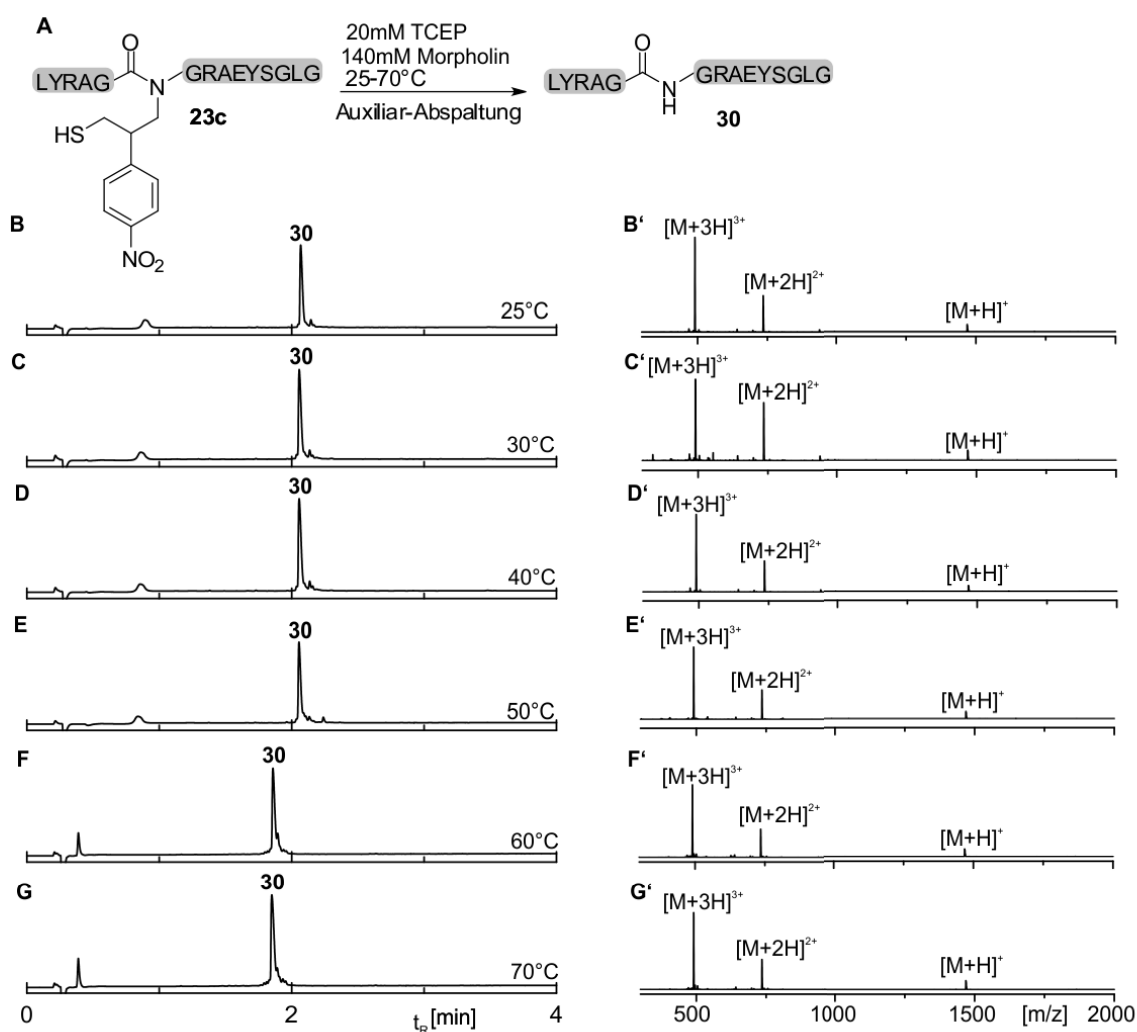


Abbildung 70: Synthese des nativen Peptids **30** durch Abspaltung des 6-Ring-Nitrophenylauxiliars vom Ligationsprodukt **23c** (A); UPLC-(B-G) und ESI-MS-Analysen (B'-G') der gereinigten Produkte.

6.9. Synthese und Anwendung des 5NP-Auxiliars

6.9.1. Synthese des Auxiliar-Vorläufermoleküls 57

Thioether 56

Das Epoxid^[84] **55** (869 mg, 4.85 mmol) wurde bei 50°C mit *tert*-Butylmercaptan (1.10 ml, 880 mg, 9.75 mmol) und einer katalytischen Menge TBAF*3H₂O (79 mg, 0.25 mmol) umgesetzt. Nach 18 h wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und das verbleibende Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4/1, v/v). Dabei wurde das gewünschte Produkt (1.03 g, 3.81 mmol, 79%) als gelbes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.14-8.11 (m, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, *J*₃ = 2.0 Hz, 2H), 7.41-7.39 (m, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, *J*₃ = 2.0 Hz, 2H), 3.94-3.89 (m, 1H), 2.96- 2.93 (m, *J*₁ = 13.5 Hz, *J*₂ = 4.5 Hz, 1H) 2.89-2.85 (m, *J*₁ = 14.0 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, 1H), 2.76-2.72 (m, *J*₁ = 13.0 Hz, *J*₂ = 4.5 Hz, 1H), 2.62 (s, 1H), 2.58-2.54 (m, *J*₁ = 13.0 Hz, *J*₂ = 7.5 Hz, 1H), 1.29 (s, 9H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 146.8, 146.3, 130.4, 123.6, 70.6, 42.8, 42.5, 35.9, 31.1.

HRMS (ESI): *m/z* = 270.1160 (C₁₃H₂₀NO₃S (M+H)⁺, ber.: 270.1164); C₁₃H₁₉NO₃S (MW = 269.35 g·mol⁻¹).

Keton 57

Der Alkohol **56** (969 mg, 3.60 mmol) wurde in einem Gemisch von DCM/*tert*-Butylalkohol (9/1, v/v; 22 mL) gelöst und mit Dess-Martin-Periodinan (12.6 g, 4.43 mmol, 15 Gew.-% Lösung in DCM) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe einer wässrigen Lösung von 10 Gew.-% NaHCO₃/ges. NaHSO₃ (1/1, v/v; 20 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit Ethylacetat (2 x 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (558 mg, 2.09 mmol, 58%) als gelblicher Feststoff erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.16-8.14 (m, 2H), 7.39-7.37 (m, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 1.30-1.29 (m, 9H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 203.6, 147.1, 141.7, 130.7, 123.8, 46.4, 43.9, 39.5, 30.8.

HRMS (ESI): m/z = 266.0856 ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_3\text{S}$ (M-H) $^-$, ber.: 266.0845); $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$ (MW = 267.34 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

6.9.2. Synthese der 5NP-Auxiliarpeptide

Die Peptide wurden an einem Rink-Amid-Harz nach der Fmoc-SPPS aufgebaut (Kapitel 6.4.1) und das Auxiliar durch reduktive Aminierung auf der Festphase eingeführt. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten (Kapitel 6.4.1), die Thiofunktion deblockiert (Kapitel 6.7.2) und die Auxiliarpeptide mit Hilfe der präparativen HPLC gereinigt.

Einführung des 5NP-Auxiliars (reduktive Aminierung auf der Festphase): Das Harz wurde in DMF gequollen (~5 min) und anschließend mit einer Lösung des Ketons **57** (15 Äq.; c = 0.4 M) und NaCNBH_3 (15 Äq.; c = 0.4 M) in DMF/MeOH/AcOH/TMOF (3/3/3/1, v/v/v/v) behandelt. Nach 16 h wurde die Lösung abgetrennt und das Harz gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM).

60: UPLC: t_R = 2.67 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1103.6 ((M+H) $^+$, ber.: 1103.5), 552.4 ((M+2H) $^{2+}$, ber.: 552.3); Summenformel: $\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{N}_{14}\text{O}_{15}\text{S}$; MW = 1103.20 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 20 μmol ; Ausbeute: 3.97 μmol (20%; A_{280} = 0.99, V_{Probe} = 4 mL). *Anmerkung: Deblockierung der Thiofunktion nach Variante A (Kapitel 6.7.2.).*

69: UPLC: t_R = 1.49 min (3-60% B in 2 min); ESI-MS: 1227.5 ((M+H) $^+$, ber.: 1227.5), 614.3 ((M+2H) $^{2+}$, ber.: 614.3); Summenformel: $\text{C}_{57}\text{H}_{74}\text{N}_{14}\text{O}_{15}\text{S}$; MW: 1227.35 g/mol; präparative HPLC-Reinigung: 3-60% B in 30 min; Synthesemaßstab: 5.7 μmol ; Ausbeute: 285 nmol (5%; A_{280} = 0.14, V_{Probe} = 2 mL). *Anmerkung: Deblockierung der Thiofunktion nach Variante A (Kapitel 6.7.2.).*

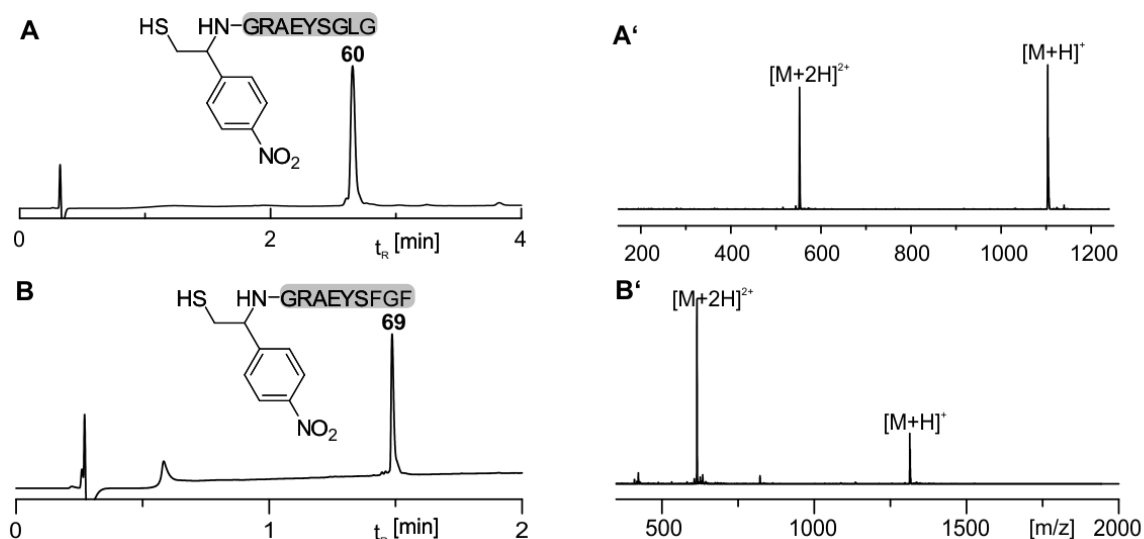


Abbildung 71: UPLC-(A-B) und ESI-MS-Analysen (A'-B') der gereinigten Auxiliarpeptide 60 und 69.

6.9.3. Anwendung des 5NP-Auxiliars

Synthese des Ligationsproduktes 64G:

Die Synthese des Ligationsproduktes **64G** erfolgte wie in Kapitel 6.5 beschrieben: Für die ENCL-Reaktion wurde das Auxiliarpeptid **60** (2.0 μmol) mit dem Peptidthioester **22G** (2.0 μmol) in einem wässrigen Ligationpuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH_2PO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration 4 mM). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS verfolgt. Nach 2 h wurde das Ligationsprodukt **64G** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

64G: UPLC-MS: $t_R = 2.87$ min (3-40% B in 2 min); 832.7 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 832.4), 555.8 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 555.4); Summenformel: $\text{C}_{73}\text{H}_{110}\text{N}_{22}\text{O}_{21}\text{S}$; MW: 1663.85 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 2.0 μmol ; Ausbeute: 1.32 μmol (66%; $A_{280} = 0.74$, $V_{\text{Probe}} = 2$ mL).

Auxiliar-Abspaltung (analytischer Maßstab)

Die Durchführung der Auxiliar-Abspaltung erfolgte wie in Kapitel 6.6. beschrieben (Bedingungen siehe Kapitel 4.1.8.).

Auxiliar-Abspaltung (präparativer Maßstab)

Das Ligationsprodukt **64G** wurde in einer wässrigen Lösung von TCEP (20 mM) und Morpholin (140 mM) gelöst (Peptidkonzentration = 0.5 mM) und das Reaktionsgemisch bei 40°C geschüttelt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS verfolgt. Nach 22 h wurde das native Peptid **30** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

30: UPLC: t_R = 1.15 min (3-40% B in 2 min); ESI-MS: 1469.6 ((M+H)⁺, ber.: 1468.8), 735.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9); 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉; MW: 1468.61 g/mol; Synthesemaßstab: 177 nmol; Ausbeute: 82 nmol (50% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.165, V_{Probe} = 500 µL; UV-Spektrometer).

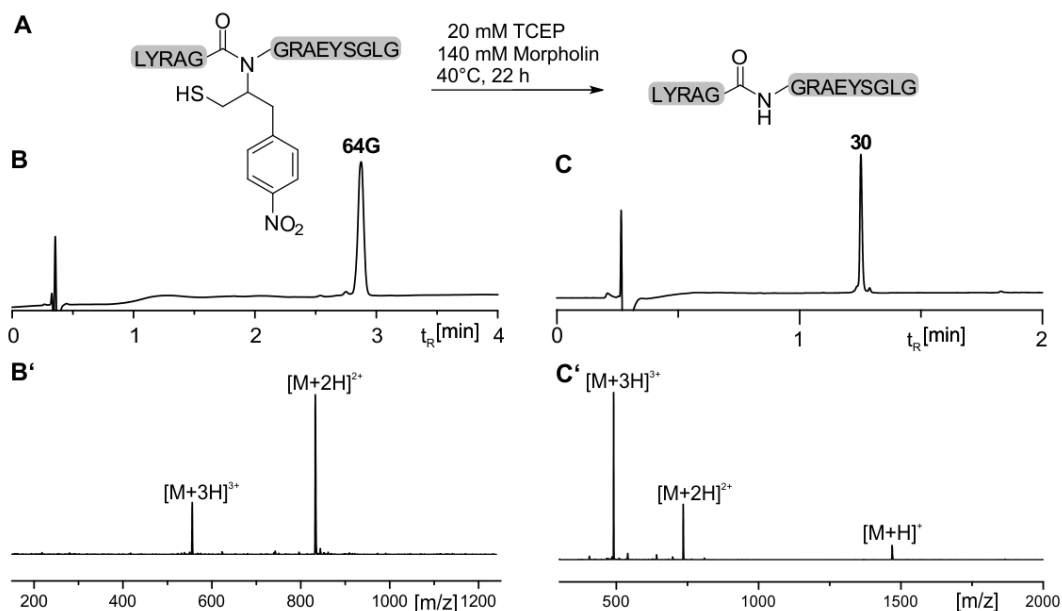


Abbildung 72: Abspaltung des 5NP-Auxiliars vom gereinigten Ligationsschutzprodukt **64G** (A): UPLC-(B-C) und ESI-MS-Analysen (B'-C') des gereinigten Ligationsschutzproduktes **64G** und des nativen Peptids **30**.

6.10. Vergleich des 5NP- und 6NP-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Die Peptidligationen wurden wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktion wurden die Auxiliarpeptide **20c** und **60** mit dem Peptidthioester **22G**, **22A**, **22L** (1 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 5 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC- und HPLC-MS-Analyse verfolgt.

63G: UPLC: t_R = 2.9 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1663.7 ((M+2H)²⁺, ber.: 1663.8), 832.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 832.4), 555.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 555.4); Summenformel: C₇₃H₁₁₀N₂₂O₂₁S.

64G: UPLC: t_R = 2.7 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1663.6 ((M+2H)²⁺, ber.: 1663.8), 832.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 832.4), 555.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 555.4); Summenformel: C₇₃H₁₁₀N₂₂O₂₁S.

63A: UPLC: t_R = 3.0 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1677.5 ((M+H)⁺, ber.: 1677.8), 839.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 839.4); 560.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 559.9); Summenformel: C₇₃H₁₁₂N₂₂O₂₁S.

64A: UPLC: t_R = 2.7 min (3-40% B in 4 min); ESI-MS: 1677.6 ((M+H)⁺, ber.: 1677.8), 839.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 839.4); 560.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 559.9); Summenformel: C₇₄H₁₁₂N₂₂O₂₁S.

63L: UPLC: t_R = 7.3-7.5 min (3-40% B in 10 min); ESI-MS: 1719.8 ((M+H)⁺, ber.: 1719.9), 860.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 860.4); 574.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 574.0). Summenformel: C₇₇H₁₁₈N₂₂O₂₁S.

64L: UPLC: t_R = 7.1-7.3 min (3-40% B in 10 min); ESI-MS: 1720.8 ((M+H)⁺, ber.: 1719.9), 860.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 860.4); 574.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 574.0). Summenformel: C₇₇H₁₁₈N₂₂O₂₁S.

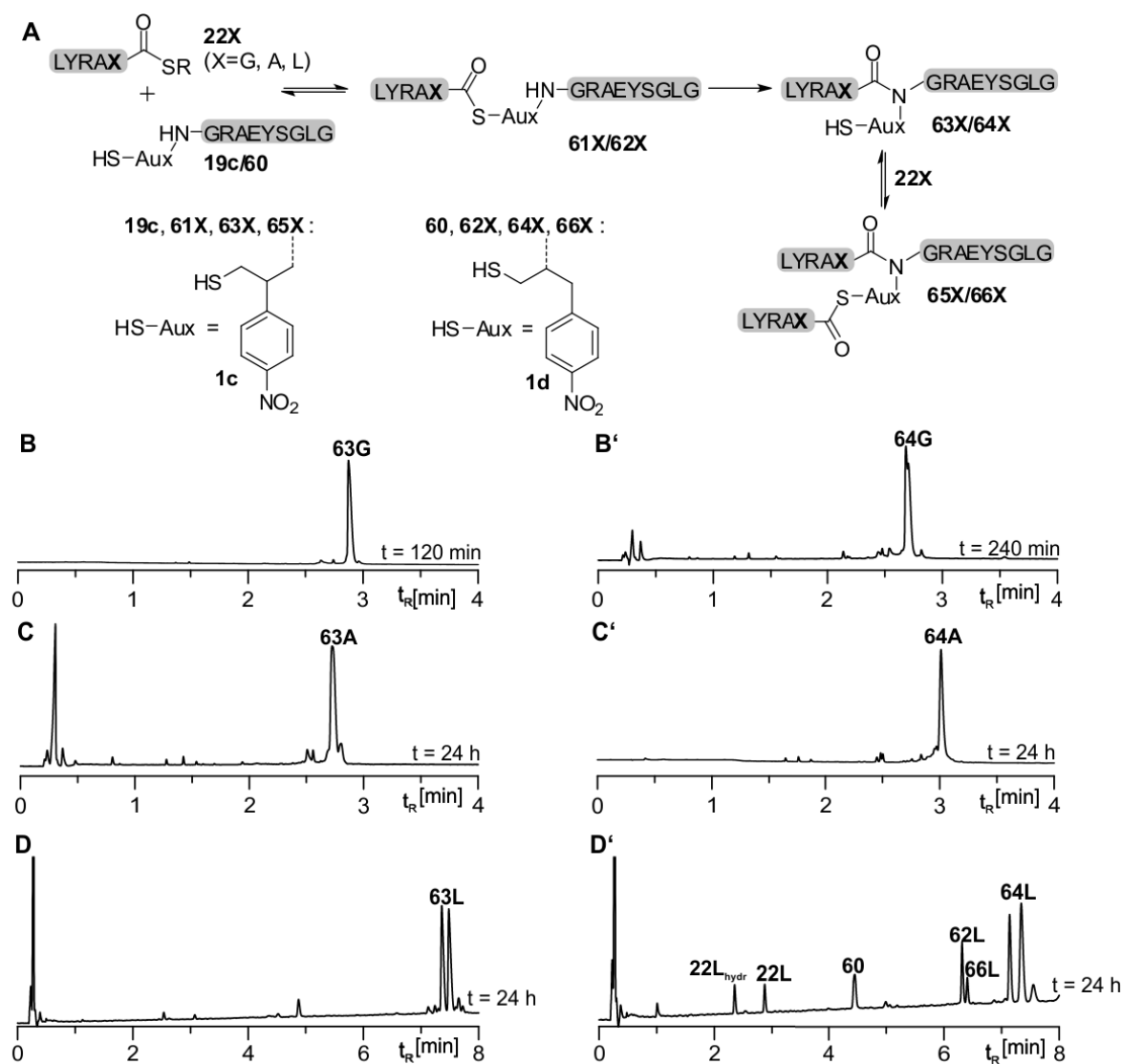


Abbildung 73.: Anwendung des 5NP- und 6NP-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen der Gly-Gly-(B; B'), Ala-Gly-(C, C') und Leu-Gly-Ligation (D-D'). Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 5.0 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH; pH 7.5, RT; R: $(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

6.11. Abspaltung des 5NP- und 6NP-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation

Die Peptidligationen wurden wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktion wurden die Auxiliarpeptide **45** und **69** mit dem Peptidthioester **22G** (1.25 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2 mM). Nach fünf Stunden wurde eine wässrige Lösung von TCEP (0.1 M) und Morpholin (0.4 M) zugesetzt (Peptidkonzentration = 0.5 mM) und das Reaktionsgemisch bei 40°C geschüttelt. Nach 20 h wurde das native Peptid **46** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

46 (6NP): HPLC-MS: t_R = 12.4 min (3-60% B in 20 min); 1592.8 ((M+H)⁺, ber.: 1592.8), 797.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 796.9); 531.8 ((M+3H)³⁺, ber.: 531.6); Summenformel: C₇₄H₁₀₅N₂₁O₁₉; MW: 1592.75 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-60% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 91 nmol (50% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.310 (2-fach verdünnt), V_{Probe} = 250 µL; UV-Spektrometer).

46 (5NP): HPLC-MS: t_R = 12.4 min (3-60% B in 20 min); 1592.8 ((M+H)⁺, ber.: 1592.8), 797.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 796.9); 531.8 ((M+3H)³⁺, ber.: 531.6); Summenformel: C₇₄H₁₀₅N₂₁O₁₉; MW: 1592.75 g/mol; semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-60% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 50 nmol (27% (14 nmol für Analyse); A₂₈₀ = 0.166 (2-fach verdünnt), V_{Probe} = 250 µL; UV-Spektrometer).

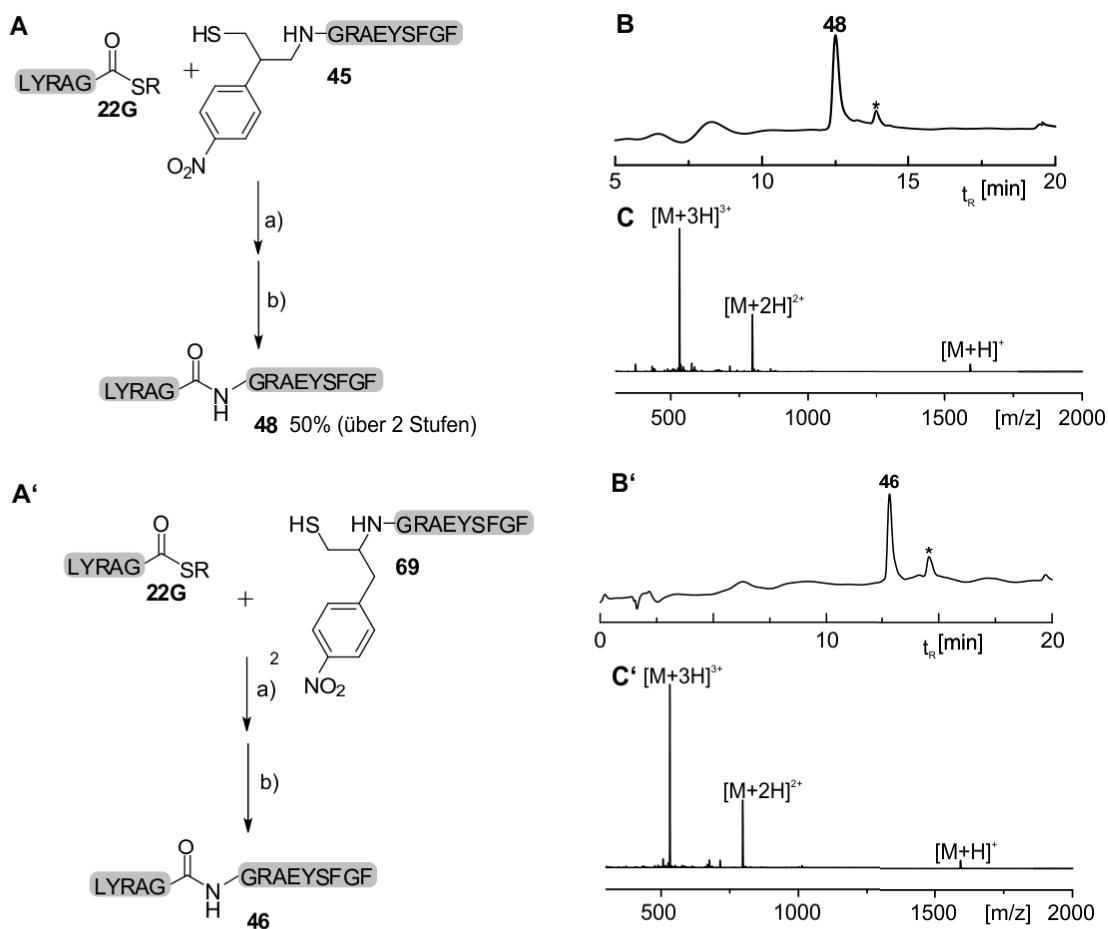
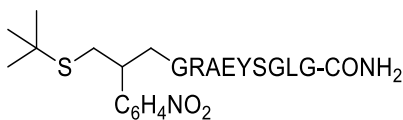
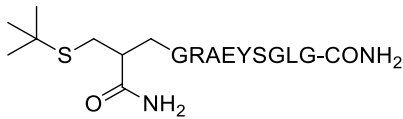
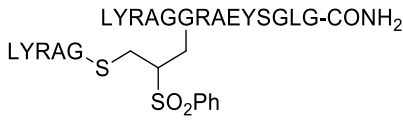
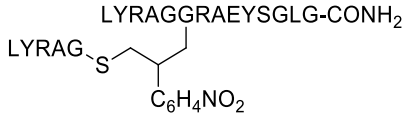
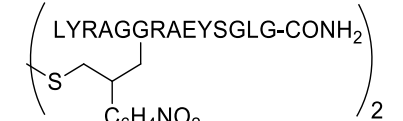
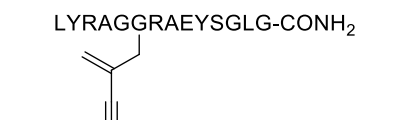
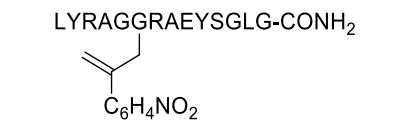
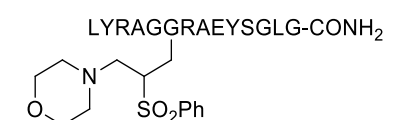
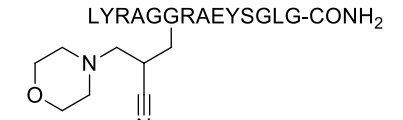
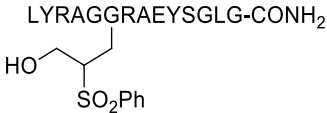
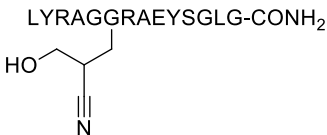
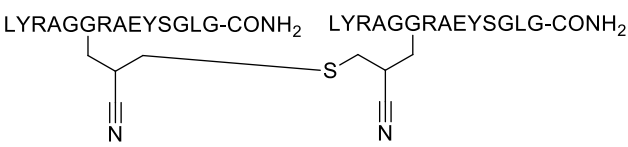
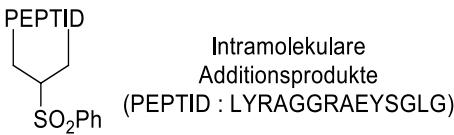
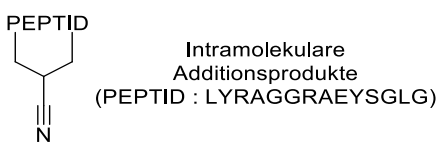
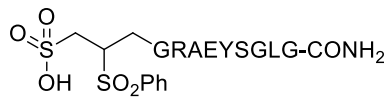
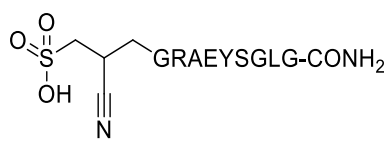
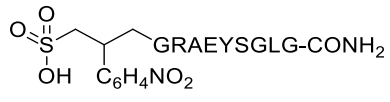



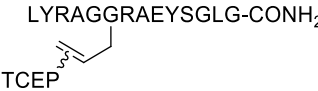
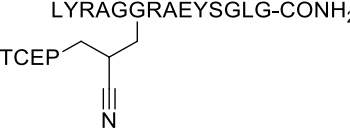
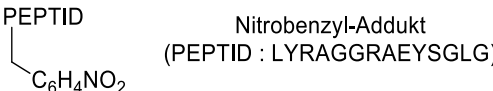
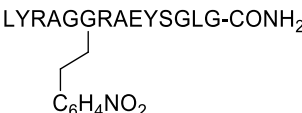
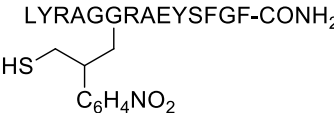
Abbildung 74: Auxiliar-Abspaltung im direkten Anschluss an die Peptidligation (A-A'): HPLC-(B-B') und ESI-MS-Analysen (C-C') des gereinigten nativen Peptids **46**. Bedingungen: a) $c(\text{Peptid}) = 2.0 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5, RT, 5 h; b) $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 100 mM TCEP , 400 mM Morpholin , pH 8.5, 40°C , 20 h; R: $(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

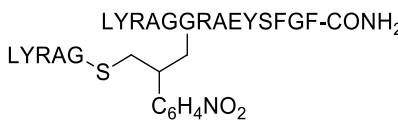
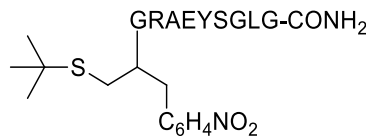
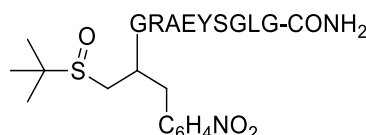
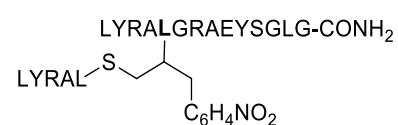
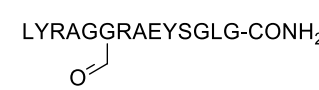
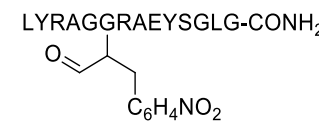
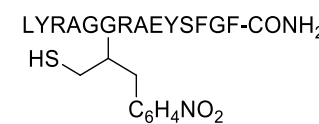
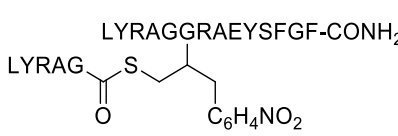
6.11.1. Ergänzende Analytik zu Kapitel 4.1

Nummer	Vermutete Struktur	Analytik
19a		UPLC-MS: $t_R = 3.6$ min (3-40% B in 4 min); 1178.7 ($[M+H]^+$, ber.: 1178.5), 589.8 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 513.2); Summenformel: $\text{C}_{51}\text{H}_{79}\text{N}_{13}\text{O}_{15}\text{S}_2$.
19b		UPLC-MS: $t_R = 3.0$ min (3-40% B in 4 min); 1063.7 ($[M+H]^+$, ber.: 1063.5), 532.5 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 532.3); Summenformel: $\text{C}_{46}\text{H}_{74}\text{N}_{14}\text{O}_{13}\text{S}$.

19c		HPLC-MS: t_R = 3.0 min (3-40% B in 20 min); 1159.5 ((M+H) ⁺ , ber.: 1159.6), 580.3 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 580.4). Summenformel: C ₅₁ H ₇₈ N ₁₄ O ₁₅ S.
21b		UPLC-MS: t_R = 2.3 min (3-40% B in 4 min); 1025.4 ((M+H) ⁺ , ber.: 1025.5), 513.7 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 513.2); Summenformel: C ₄₆ H ₇₆ N ₁₄ O ₁₄ S.
23a		UPLC-MS: t_R = 2.9 min (3-40% B in 4 min); 1122.8 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 1122.5), 748.9 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 749.3); Summenformel: C ₉₉ H ₁₅₁ N ₂₉ O ₂₇ S ₂ .
23c		UPLC-MS: t_R = 3.1 min (3-40% B in 4 min); 1113.5 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 1113.1), 742.7 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 742.4); Summenformel: C ₉₉ H ₁₅₀ N ₃₀ O ₂₇ S.
(23c)₂		UPLC-MS: t_R = 3.2-3.3 min (3-40% B in 4 min); 1109.3 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 1109.2), 832.5 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 832.2); Summenformel: C ₁₄₆ H ₂₁₈ N ₄₄ O ₄₂ S ₂ .
25b		UPLC-MS: t_R = 2.3 min (3-40% B in 4 min); 767.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 767.4), 512.1 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 511.9); Summenformel: C ₆₈ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₁₉ .
25c		UPLC-MS: t_R = 3.1 min (3-40% B in 4 min); 815.4 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 815.4); Summenformel: C ₇₃ H ₁₀₈ N ₂₂ O ₂₁ .
26a		UPLC-MS: t_R = 2.8-2.9 min (3-40% B in 4 min); 868.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 868.4); 579.5 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 579.3); Summenformel: C ₇₇ H ₁₁₈ N ₂₂ O ₂₂ S.
26b		UPLC-MS: t_R = 2.1 min (3-40% B in 4 min); 811.3 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 810.9), 541.3 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 541.0); Summenformel: C ₇₂ H ₁₁₃ N ₂₃ O ₂₀ .

27a		UPLC-MS: t_R = 2.9 min (3-40% B in 4 min); 833.9 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 833.9), 556.9 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 556.3); Summenformel: C ₇₃ H ₁₁₁ N ₂₁ O ₂₂ S.
27b		UPLC-MS: t_R = 2.2 min (3-40% B in 4 min); 776.7 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 776.4), 518.2 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 517.9); Summenformel: C ₆₈ H ₁₀₆ N ₂₂ O ₂₀ .
28a		UPLC-MS: t_R = 2.5 min (3-40% B in 4 min); 1034.5 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 1033.9), 776.7 ((M+4H) ⁴⁺ , ber.: 775.6); Summenformel: C ₁₃₆ H ₂₀₈ N ₄₄ O ₃₈ S.
29b		UPLC-MS: t_R = 2.8-2.9 min (3-40% B in 4 min); 825.2 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 824.9), 550.7 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 550.3); Summenformel: C ₇₃ H ₁₀₉ N ₂₁ O ₂₁ S.
29b		UPLC-MS: t_R = 2.9-3.3 min (3-40% B in 4 min); 767.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 767.4), 512.1 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 511.9); Summenformel: C ₆₈ H ₁₀₄ N ₂₂ O ₁₉ .
32a		UPLC-MS: t_R = 2.8 min (3-40% B in 4 min); 866.2 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 865.9), 578.0 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 577.6); Summenformel: C ₇₃ H ₁₁₀ N ₂₁ O ₂₁ S.
32b		UPLC-MS: t_R = 2.5 min (3-40% B in 4 min); 808.9 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 808.4), 539.8 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 539.3); Summenformel: C ₆₈ H ₁₀₆ N ₂₂ O ₂₂ S.
32c		UPLC-MS: t_R = 2.7 min (3-40% B in 4 min); 849.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 848.4), 566.6 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 565.9); Summenformel: C ₇₃ H ₁₁₀ N ₂₂ O ₂₄ S.
33		UPLC-MS: t_R = 2.7 min (3-40% B in 4 min); 754.9 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 754.9), 503.7 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 503.6); Summenformel: C ₆₇ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₁₉ .

34		UPLC-MS: t_R = 2.4-2.5 min (3-40% B in 4 min); 879.2 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 878.9), 586.5 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 586.3); Summenformel: C ₇₆ H ₁₁₈ N ₂₁ O ₂₅ P.
35		UPLC-MS: t_R = 2.1 min (3-40% B in 4 min); 892.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 892.4), 595.8 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 595.3); Summenformel: C ₇₇ H ₁₁₉ N ₂₂ O ₂₅ P.
36		UPLC-MS: t_R = 2.4 min (3-40% B in 4 min); 801.8 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 802.4), 535.4 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 535.5); Summenformel: C ₇₁ H ₁₀₆ N ₂₂ O ₂₁ .
37		UPLC-MS: t_R = 2.3 min (3-40% B in 4 min); 809.7 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 809.4), 540.2 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 539.9); Summenformel: C ₇₂ H ₁₀₈ N ₂₂ O ₂₁ .
39	LYRAG-COOH	HPLC-MS: t_R = 1.2 min (3-40% B in 20 min); 579.2 ((M+H) ⁺ , ber.: 579.3); Summenformel: C ₂₆ H ₄₂ N ₈ O ₇ .
40	LYRA-COOH	HPLC-MS: t_R = 1.2 min (3-40% B in 20 min); 521.4 ((M+H) ⁺ , ber.: 522.3); Summenformel: C ₂₄ H ₃₉ N ₇ O ₆ .
42	CHO-GRAEYSGLG-CONH ₂	HPLC-MS: t_R = 12.2 min 3-40% B in 20 min); 936.4 ((M+H) ⁺ , ber.: 936.5); Summenformel: C ₃₉ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₄ .
43	GRAEYSGLG-CONH ₂	HPLC-MS: t_R = 10.9 min 3-40% B in 20 min); 908.4 ((M+H) ⁺ , ber.: 908.5); Summenformel: C ₃₈ H ₆₁ N ₁₃ O ₁₃ .
44	RAEYSGLG-CONH ₂	HPLC-MS: 851.4 ((M+H) ⁺ , ber.: 851.4); Summenformel: C ₃₆ H ₅₈ N ₁₂ O ₁₂ .
47		HPLC-MS: t_R = 17.2 min (3-60% B in 20 min); 1788.7 ((M+H) ⁺ , ber.: 1788.8), 894.5 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 894.4);

47*		<p>Summenformel: C₈₃H₁₁₄N₂₂O₂₁S.</p> <p>HPLC-MS: t_R = 15.1 min (3-60% B in 20 min); 1175.1 ((M+2H)²⁺, ber.: 1175.1), 783.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 783.7); Summenformel: C₁₀₉H₁₅₄N₃₀O₂₇S.</p>
59		<p>UPLC-MS: t_R = 3.3 min (3-40% B in 20 min); 1159.7 ((M+H)⁺, ber.: 1159.6), 580.6 ((M+2H)²⁺, ber.: 580.4). Summenformel: C₅₁H₇₈N₁₄O₁₅S.</p>
59*		<p>UPLC-MS: t_R = 2.8 min (3-40% B in 20 min); 1175.4 ((M+H)⁺, ber.: 1175.6), 588.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 588.3). Summenformel: C₅₁H₇₈N₁₄O₁₆S.</p>
66L		<p>UPLC-MS: t_R = 6.4 min (3-40% B in 10 min); 1169.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 1169.1), 779.9 ((M+3H)³⁺, ber.: 779.8). Summenformel: C₁₀₇H₁₆₆N₃₀O₂₇S.</p>
67		<p>UPLC-MS: 748.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 748.9), 499.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 499.6); Summenformel: C₆₅H₁₀₁N₂₁O₂₀.</p>
68		<p>UPLC-MS: 823.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 823.4), 549.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 549.3); Summenformel: C₇₃H₁₀₈N₂₂O₂₂.</p>
70		<p>HPLC-MS: t_R = 17.2 min (3-60% B in 20 min); 1788.7 ((M+H)⁺, ber.: 1788.8), 894.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 894.4); Summenformel: C₈₃H₁₁₄N₂₂O₂₁S.</p>
70*		<p>HPLC-MS: t_R = 15.1 min 3-60% B in 20 min; 1175.1 ((M+2H)²⁺, ber.: 1175.1), 783.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 783.7); Summenformel: C₁₀₉H₁₅₄N₃₀O₂₇S.</p>

6.12. Synthese und Anwendung des 2MPE-Auxiliars

Phenylacetic acid is converted to the bromide **81** (a, b). **81** is then converted to the thiol **82** (c, d). **82** is converted to the thioether **S1** (e). Finally, **S1** is converted to the aldehyde **83** (f).

Weinrebamid 81

169

abschließend unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde in CCl_4 (25 mL) gelöst und dazu *N*-Bromsuccinimid (2.67 g, 15.0 mmol) gegeben. Unter starkem Rühren wurde das Reaktionsgemisch mit einer UV-Lampe (250 W) für acht Stunden bestrahlt, anschließend filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (1.22 g, 4.71 mmol, 47% über zwei Stufen) als gelbes Öl erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.57-7.55 (m, 2H), 7.37-7.29 (m, 3H), 6.00 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.21 (s, 3H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 168.3, 136.7, 129.1, 128.9, 128.8, 61.6, 45.4, 32.9.

HRMS (ESI): m/z = 258.0126 ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{BrNO}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, ber.: 258.0130); $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{BrNO}_2$ (MW = 258.12 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Thiol 82

Das Alkylbromid **81** (5.63 g, 21.7 mmol) wurde in Aceton (50 mL) mit Kalium-O-Ethylthiocarbonat (3.82 g, 23.9 mmol) bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach zwei Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in DCM/Wasser (100 mL, 1/1, v/v) aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Wasser (2 x 50 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und abschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde unter Schutzgas-Atmosphäre in trockenem DCM (40 mL) gelöst, auf 0 °C gekühlt und Piperidin (2 mL, 2.32 g, 27.3 mmol) tropfenweise zugegeben. Nach zwei Stunden wurde die organische Phase mit 1 M HCl (2 x 20 mL) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 4/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (3.44 g, 16.3 mmol, 75% über zwei Stufen) als gelbes Öl erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.35-7.33 (m, 2H), 7.26-7.22 (m, 2H), 7.19-7.15 (m, 1H), 5.11 (d, J = 5 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 2.64 (d, J = 5 Hz, 1H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.3, 139.9, 128.7, 127.6, 127.7, 61.4, 43.1, 32.7.

HRMS (ESI): m/z = 443.1075 ($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, ber.: 443.1010, Disulfid von **82**); $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$ (MW = 211.28 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Weinrebamid S1

Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde DMT-Cl (356 mg, 1.05 mmol) und DIPEA (136 mg, 180 μL , 1.06) zu einer Lösung des Thiols **82** (185 mg, 0.88 mmol) in trockenem DCM (5 mL) hinzugefügt. Nach 30 min wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/EDMA = 1/0.005, v/v \rightarrow Cyclohexan/Ethylacetat/EDMA = 4/1/0.005, v/v/v). Dabei wurde das gewünschte Produkt (372 mg, 0.72 mmol, 82%) als weißer Feststoff erhalten.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.33-7.30 (m, 2H), 7.23-7.20 (m, 4H), 7.17-7.09 (m, 6H), 7.04-7.02 (m, 2H), 6.68-6.65 (m, 4H), 4.53 (s, 1H), 3.69 (d, J = 0.75 Hz, 2H), 3.11 (s, 3H), 2.90 (s, 3H).

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.6, 158.2, 145.1, 138.2, 136.9, 136.9, 131.2, 131.1, 129.8, 128.8, 128.7, 128.5, 128.5, 127.8, 127.4, 126.7, 113.1, 68.4, 61.2, 55.3, 50.2, 32.6.

HRMS (ESI): m/z = 536.1870 ($\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{SNa}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, ber.: 536.1871); $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{NO}_4\text{S}$ (MW = 513.65 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Aldehyd 83

Zu einer gekühlten Lösung (-78 $^\circ\text{C}$) von **S1** (180 mg, 0.35 mmol) in trockenem THF (5 mL) wurde tropfenweise LiAlH_4 (100 μL , 0.35 mmol, 3.5 M in THF/Toluol) gegeben. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO_4 -Lösung (25 mL, 5 Gew.-%) beendet und auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde das Gemisch mit DCM (50 mL) versetzt, die organische Phase abgetrennt, mit wässriger NaHSO_4 -Lösung (2x 50 mL, 5 Gew.-%) gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel:

Cyclohexan/Ethylacetat/EDMA = 4/1/0.005, v/v/v) und dabei das gewünschte Produkt (126 mg, 0.28 mmol, 80 %, racemische Mischung) als weißer Feststoff (Lagerung bei -20°C → rötlicher Feststoff) erhalten.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 8.98 (d, J = 3 Hz, 1H), 7.34 - 7.31 (m, 2H), 7.25 - 7.17 (m, 9H), 7.14-7.12 (m, 1H), 7.03 (m, 2H), 6.72-6.69 (m, 4H), 3.93 (d, J = 3 Hz, 1H), 3.70 (d, J = 1 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3): δ = 193.9, 158.5, 144.8, 136.5, 134.9, 131.0, 129.6, 129.0, 128.9, 128.2, 128.1, 127.1, 113.4, 68.7, 58.9, 55.4.

HRMS (ESI): m/z = 493.1238 ($\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{SK}$ ($\text{M}+\text{K}$) $^+$, ber.: 493.1240); $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{S}$ (MW = 454.58 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

6.12.2. Synthese der 2MPE-Auxiliarpeptide

Die Synthese der 2MPE-Auxiliarpeptide erfolgte wie in Kapitel 6.4. beschrieben: Die Peptide wurden auf einem Rink-Amid-Harz nach der Fmoc-SPPS aufgebaut und das 2MPE-Auxiliar durch reduktive Aminierung eingeführt. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten und in Diethylether gefällt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels präparativer HPLC gereinigt.

84G: UPLC-MS: t_R = 2.8 min (3-40% B in 4 min); m/z = 1044.7 ($(\text{M}+\text{H})^+$, ber.: 1044.4), 522.8. ($\text{C}_{46}\text{H}_{71}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}$ ($\text{M}+2\text{H}$) $^{2+}$, ber.: 522.8); Summenformel: $\text{C}_{46}\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}$ (MW = 1044.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 14.0 μmol ; Ausbeute: 3.47 μmol (25%, A_{280} = 0.46, V = 1.0 mL).

84N: UPLC-MS: t_R = 2.8 min (3-40% B in 4 min); m/z = 1101.6 ($(\text{M}+\text{H})^+$, ber.: 1101.5), 551.4 ($(\text{M}+2\text{H})^{2+}$, ber.: 551.3); Summenformel: $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_{14}\text{O}_{14}\text{S}$ (MW = 1101.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 17.4 μmol ; Ausbeute: 5.74 μmol (33%, A_{280} = 0.76, V = 1.0 mL).

84E: UPLC-MS: t_R = 2.8 min (3-40% B in 4 min); m/z = 1116.5 ($(\text{M}+\text{H})^+$, ber.: 1116.5), 558.9 ($(\text{M}+2\text{H})^{2+}$, ber.: 558.8); Summenformel: $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{13}\text{O}_{15}\text{S}$ (MW = 1116.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 8.4 μmol ; Ausbeute: 3.3 μmol (40%, A_{280} = 0.44, V = 1.0 mL).

84D: UPLC-MS: $t_R = 2.7$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1102.5$ ((M+H)⁺, ber.: 1102.5), 551.9 ((M+2H)²⁺, ber.: 551.8); Summenformel: C₄₈H₇₁N₁₃O₁₅S (MW = 1102.2 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 7.7 µmol; Ausbeute: 2.1 µmol (27%, A₂₈₀ = 0.27, V = 1.0 mL).

84R: UPLC-MS: $t_R = 2.6$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1143.5$ ((M+H)⁺, ber.: 1143.6), 572.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 572.3); Summenformel: C₅₀H₇₈N₁₆O₁₃S (MW = 1143.3 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 6.3 µmol; Ausbeute 1.8 µmol (28%, A₂₈₀ = 0.23, V = 1.0 mL).

84M: UPLC-MS: $t_R = 3.0$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1118.6$ ((M+H)⁺, ber.: 1118.5), 559.9 ((M+2H)²⁺, ber.: 559.8); Summenformel: C₄₉H₇₅N₁₃O₁₃S₂ (MW = 1118.3 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 8.2 µmol; Ausbeute: 2.7 µmol (33%, A₂₈₀ = 0.36, V = 1.0 mL).

109(Cys): UPLC-MS: $t_R = 2.9$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1090.7$ ((M+H)⁺, ber.: 1090.5), 546.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 545.7); Summenformel: C₄₇H₇₁N₁₃O₁₃S₂ (MW = 1090.3 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 10.0 µmol; Ausbeute: 3.3 µmol (33%, A₂₈₀ = 0.22, V = 2.0 mL).

114(PhAcm): UPLC-MS: $t_R = 3.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1237.9$ ((M+H)⁺, ber.: 1237.5), 619.6 ((M+2H)²⁺, ber.: 619.3); Summenformel: C₅₆H₈₀N₁₄O₁₄S₂ (MW = 1237.5 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 10.0 µmol; Ausbeute: 2.8 µmol (28%, A₂₈₀ = 0.19, V = 2.0 mL).

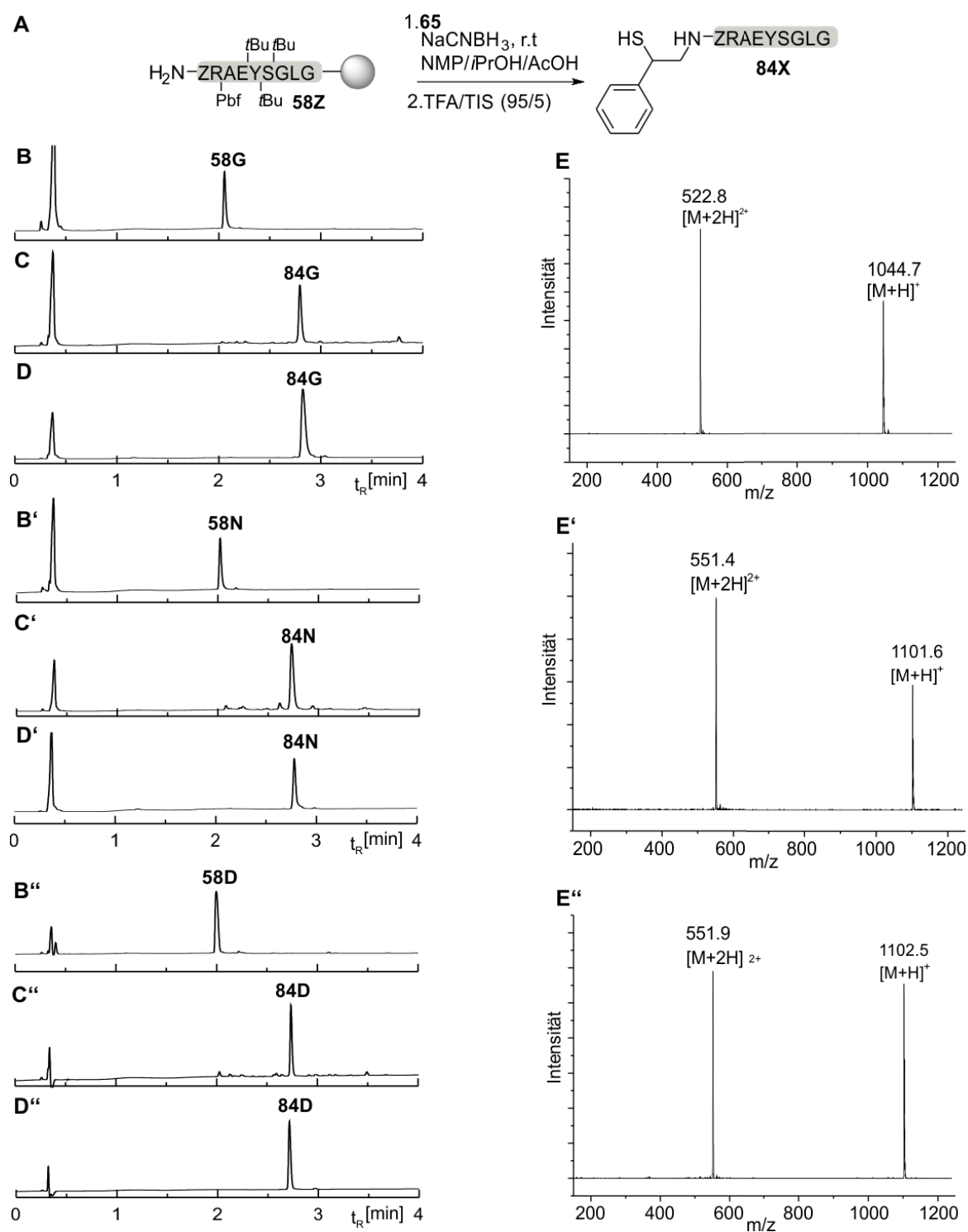


Abbildung 76: Synthese der 2MPE-Auxiliarpeptide **84Z** (A); UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der reduktiven Aminierung. UPLC-(D-D'') und ESI-MS-Analysen (E-E'') der gereinigten Peptide.

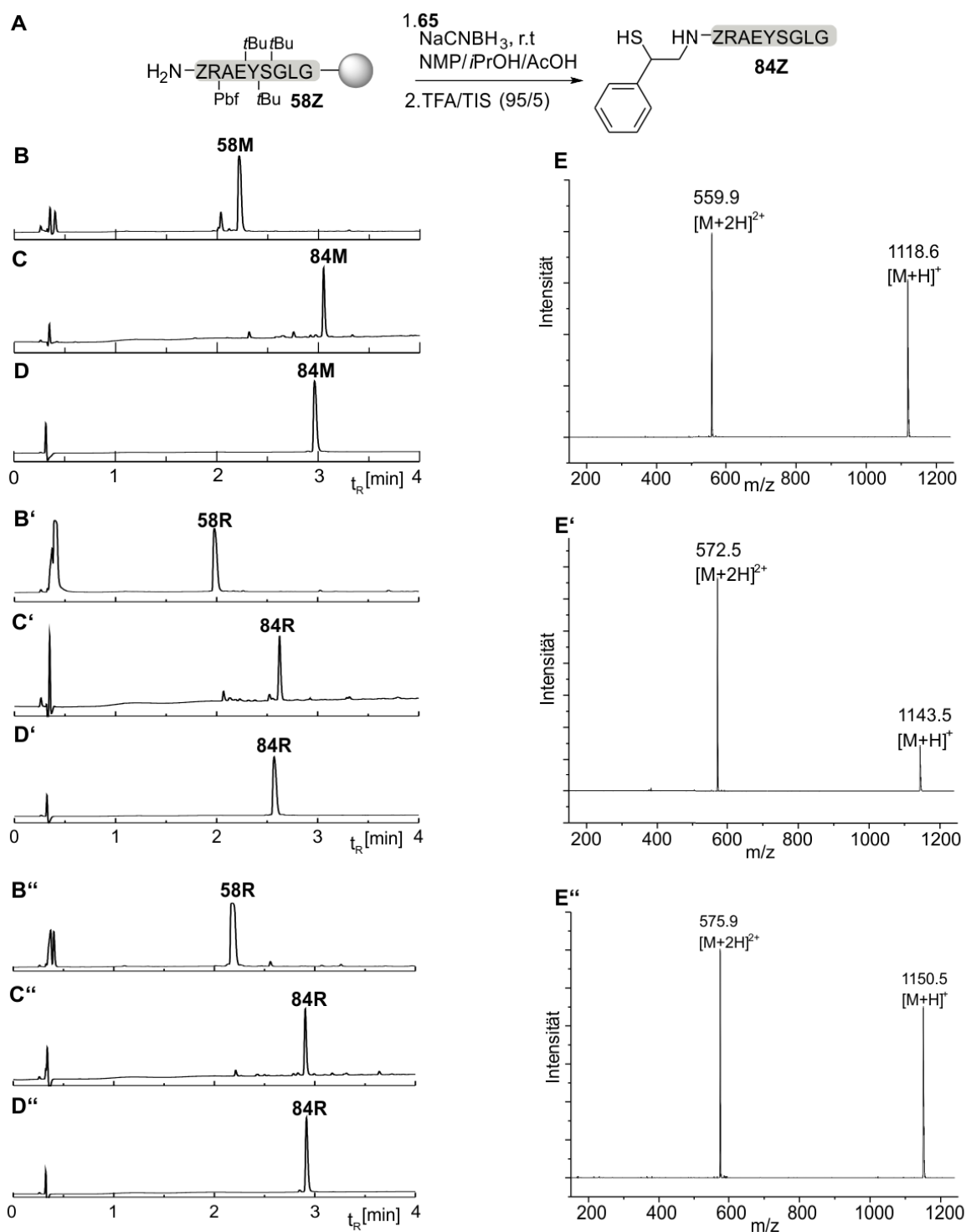


Abbildung 77: Synthese der 2MPE-Auxiliarpeptide **84Z** (A); UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der reduktiven Aminierung. UPLC-(D-D'') und ESI-MS-Analysen (E-E'') der gereinigten Peptide.

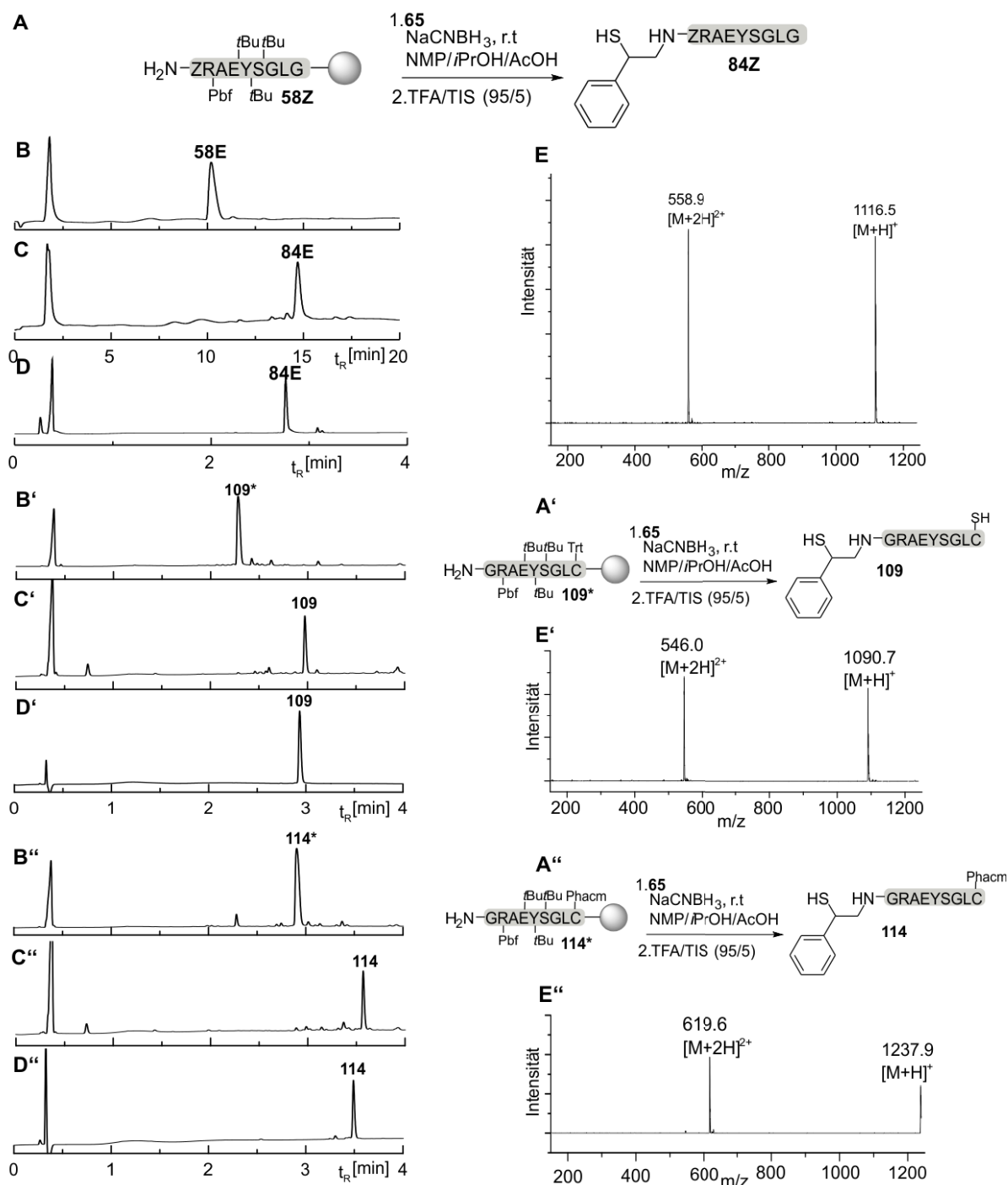


Abbildung 78: Synthese der 2MPE-Auxiliarpeptide **84E**, **109** und **114** (A-A''): UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der reduktiven Aminierung. UPLC-(D-D'') und ESI-MS-Analysen (E-E'') der gereinigten Peptide.

6.12.3. Einsatz des 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Die Peptidligationen wurden wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktionen wurden die Auxiliarpeptide **86Z** mit den Peptidthioestern **22X** (1 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 5 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt.

84GG: UPLC: t_R = 3.0 min (3-40% B in 4 min); HPLC-MS: m/z = 803.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 802.9), 536.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 536.6); Summenformel: C₇₂H₁₀₉N₂₁O₁₉S (MW = 1604.8 g·mol⁻¹).

84AG: UPLC-MS: t_R = 2.6 min (3-40% B in 4 min); m/z = 810.1 ((M+2H)²⁺, ber.: 809.9), 540.4 ((M+3H)³⁺, ber.: 540.3); Summenformel: C₇₃H₁₁₁N₂₁O₁₉S (MW = 1618.9 g·mol⁻¹).

84LG: UPLC-MS: t_R = 2.3 min (3-40% B in 4 min); m/z = 831.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 830.9), 554.3 ((M+3H)³⁺, ber.: 554.3); Summenformel: C₇₆H₁₁₇N₂₁O₁₉S (MW = 1660.9 g·mol⁻¹).

84SG: UPLC-MS: t_R = 2.5 min (3-40% B in 4 min); m/z = 818.1 ((M+2H)²⁺, ber.: 817.9), 545.8 ((M+3H)³⁺, ber.: 545.6); Summenformel: C₇₃H₁₁₀N₂₁O₂₀S (MW = 1633.8 g·mol⁻¹).

84HD: UPLC-MS: t_R = 4.9 min (3-25% B in 6 min); m/z = 872.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 871.9), 581.8 ((M+3H)³⁺, ber.: 581.6); Summenformel: C₇₈H₁₁₅N₂₃O₂₁S (MW = 1743.0 g·mol⁻¹).

84AN: UPLC-MS: t_R = 2.8 min (3-25% B in 6 min); m/z = 838.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 838.4), 559.4 ((M+3H)³⁺, ber.: 559.2.6); Summenformel: C₇₅H₁₁₄N₂₂O₂₀S (MW = 1675.9 g·mol⁻¹).

84SE: UPLC-MS: t_R = 2.5 min (3-25% B in 4 min); m/z = 854.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 853.9), 569.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 569.6); C₇₆H₁₁₅N₂₁O₂₂S (MW = 1706.9 g·mol⁻¹).

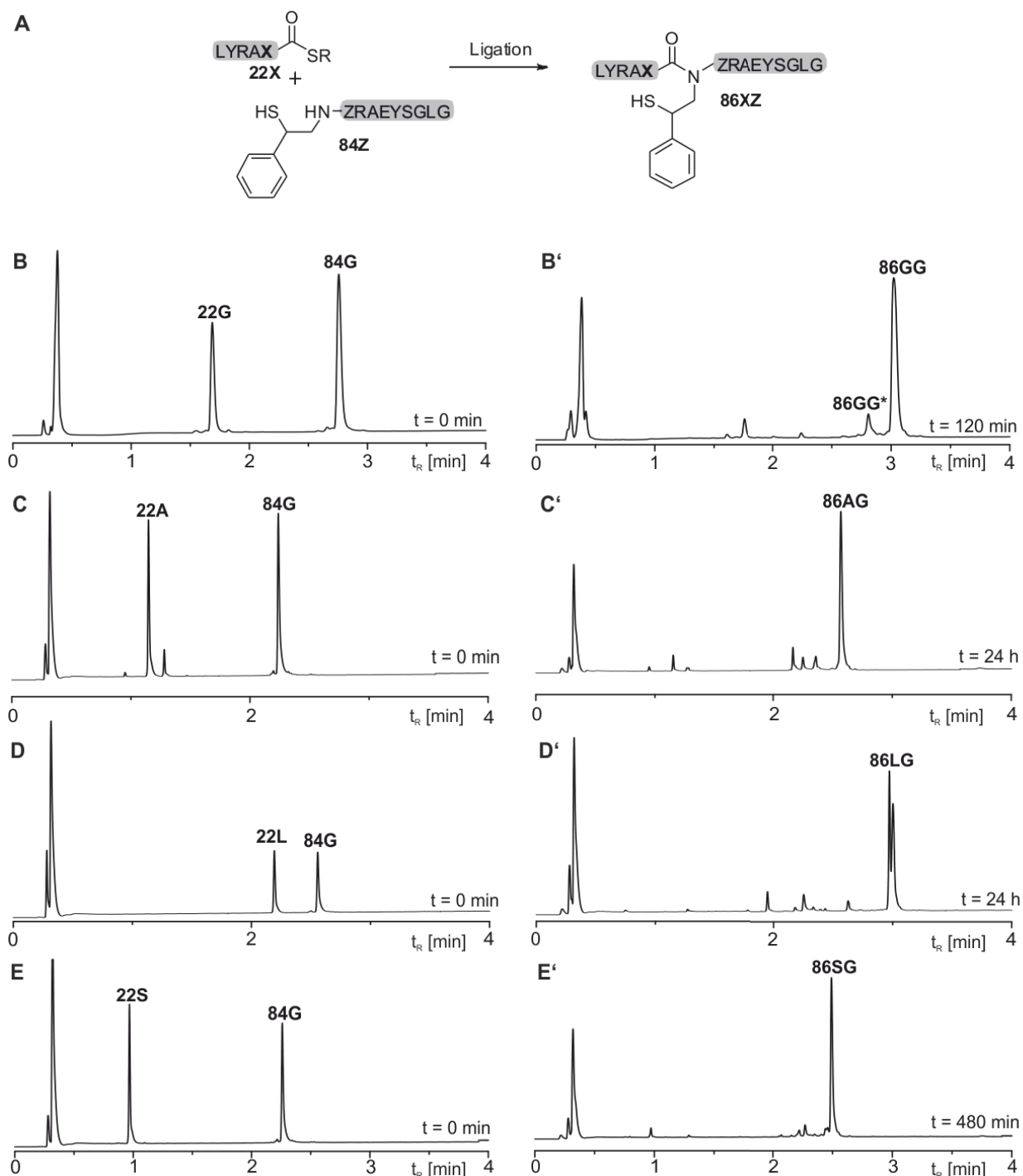


Abbildung 79: Anwendung des 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B-E) und nach (B'-E') der Peptidligation. Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 5.0 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH ; $\text{pH } 7.5$, RT ; $\text{R: } (\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

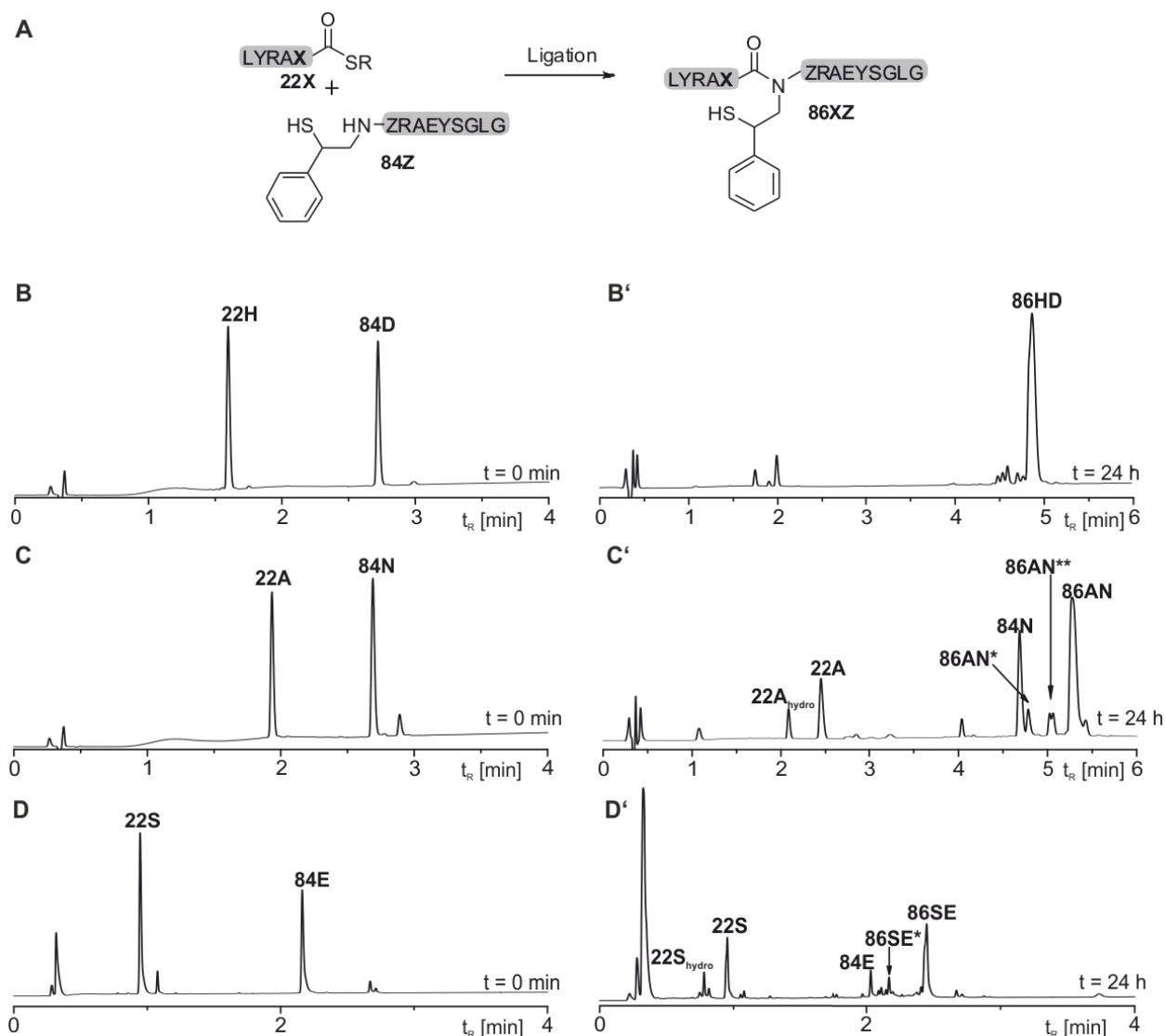


Abbildung 80: Anwendung des 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B-D) und nach (B'-D') der Peptidligation. Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 5.0 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH ; $\text{pH } 7.5$, RT ; $\text{R: } (\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

6.12.4. Synthese der 2MPE-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte

Die Synthese der Ligationsprodukte **86XZ** erfolgte wie in Kapitel 6.5 beschrieben: Für die ENCL-Reaktionen wurden die Auxiliarpeptide **84Z** mit den Peptidthioestern **22X** (1.2 - 2 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2-5 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS verfolgt und anschließend die Ligationsprodukte durch semi-präparative HPLC gereinigt.

86GG: UPLC: t_R = 3.0 min (3-40% B in 4 min); HPLC-MS: m/z = 803.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 802.9), 536.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 536.6); Summenformel: C₇₂H₁₀₉N₂₁O₁₉S (MW = 1604.8 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 0.8 µmol; Ausbeute: 0.69 µmol (84%, A₂₈₀ = 0.36, V = 500 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84G (0.8 µmol) mit 22G (0.96 µmol); c(84G) = 5 mM; Reaktionszeit: 2 h.*

86SE: UPLC-MS: t_R = 2.5 min (3-25% B in 4 min); m/z = 854.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 853.9), 569.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 569.6); Summenformel: C₇₆H₁₁₅N₂₁O₂₂S (MW = 1706.9 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 420 nmol; Ausbeute: 180 nmol (43%, A₂₈₀ = 0.19, V = 250 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84E (0.46 µmol) mit 22S (0.92 µmol); c(84E) = 5 mM; Reaktionszeit: 2 d.*

86QF: UPLC-MS: t_R = 3.8 min (3-40 % B in 4 min); m/z = 838.7 ((M+2H)²⁺, ber.: 838.4); 559.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 559.3); Summenformel: C₇₅H₁₁₄N₂₂O₂₀S (MW = 1675.9 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 2.0 µmol; Ausbeute: 1.1 µmol (54%, A₂₈₀ = 0.56, V = 500 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84F (2.0 µmol) mit 22Q (4.0 µmol); c(84F) = 2 mM; Reaktionszeit: 2 d.*

86AN: UPLC-MS: t_R = 3.5 min (3-40 % B in 4 min); m/z = 883.9 ((M+2H)²⁺, ber.: 883.9); 589.6 ((M+3H)³⁺, ber.: 589.6); Summenformel: C₈₂H₁₁₉N₂₁O₂₁S (MW = 1675.9 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 440 nmol; Ausbeute: 88 nmol (20%, A₂₈₀ = 0.23, V = 100 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84N (0.44 µmol) mit 22A (0.88 µmol); c(84N) = 2 mM; Reaktionszeit: 2 d.*

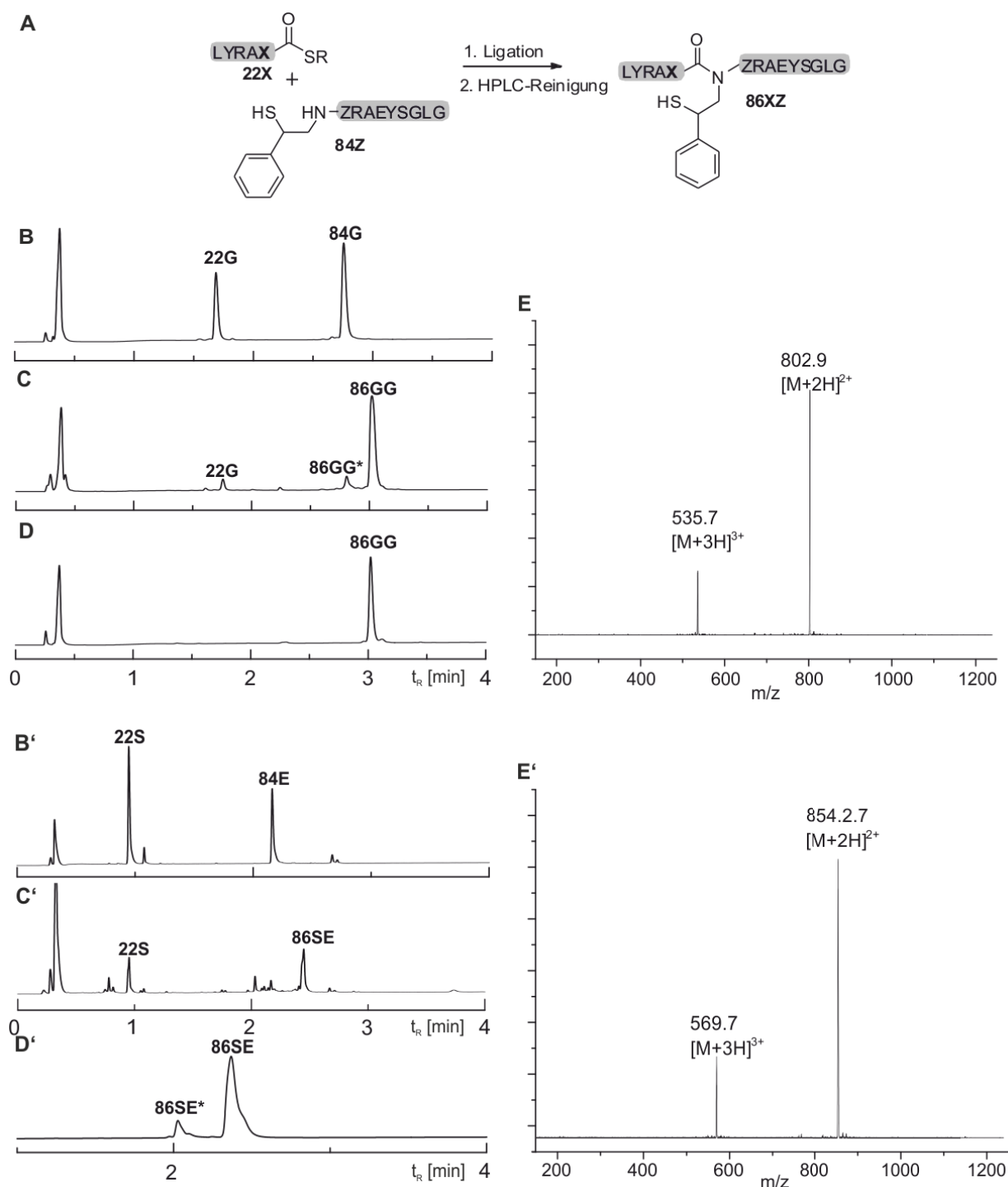


Abbildung 81: Anwendung des 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B/B') und nach (C/C') der Peptidligation. UPLC-(D/D') und ESI-MS-Analysen (E/E') der gereinigten Peptide. Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 2-5 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH ; $\text{pH } 7.5$, RT ; $\text{R}: (\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

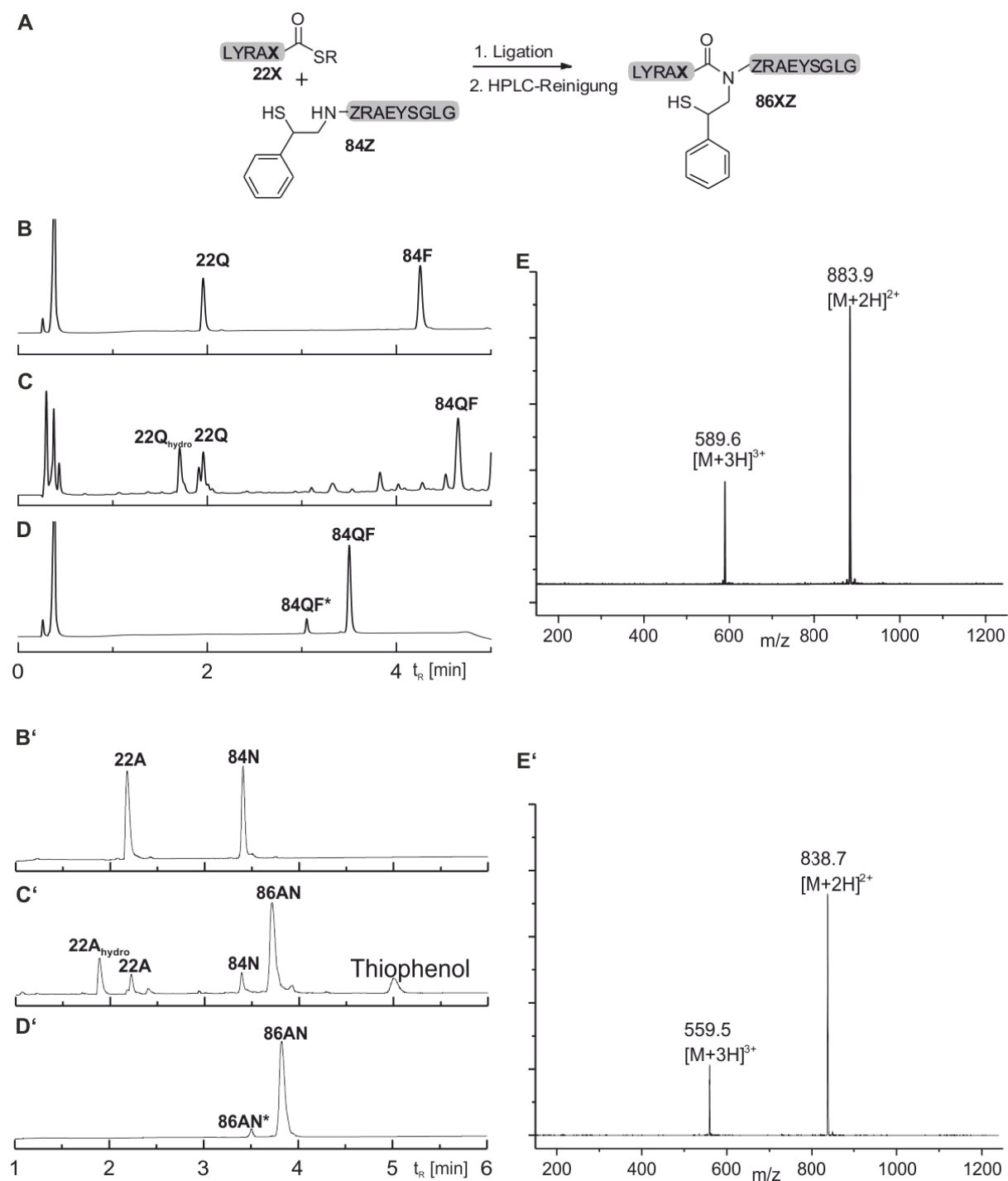


Abbildung 82: Anwendung 2MPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B/B') und nach (C/C') der Peptidligation. UPLC-(D/D') und ESI-MS-Analysen (E/E') der gereinigten Peptide. Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 2\text{--}5\text{ mM}$, $100\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH ; $\text{pH } 7.5$, RT ; $\text{R: } (\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

6.12.5. Abspaltung des 2MPE-Auxiliars an gereinigten Ligationsprodukten

Analytischer Maßstab:

Die Durchführung der Auxiliar-Abspaltung erfolgte wie in Kapitel 6.6 beschrieben: Die Ligationsprodukte **86ZX** wurden in den jeweiligen wässrigen Lösungen gelöst (Peptidkonzentration = 0.5 mM) und das Reaktionsgemisch bei der angegebenen Temperatur geschüttelt

Präparativer Maßstab:

Die Durchführung der Auxiliar-Abspaltung erfolgte wie in Kapitel 6.6 beschrieben: Die Ligationsprodukte **86ZX** wurden in einer wässrigen Lösung von TCEP (0.1 – 1.0 M) und Morpholin (0.4 – 4.0 M) gelöst (Peptidkonzentration = 0.5 mM) und das Reaktionsgemisch bei der angegebenen Temperatur (rt bis 40°C) geschüttelt (wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS verfolgt und anschließend das native Peptid **30ZX** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

30SE: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 786.3$ ((M+2H)²⁺, ber.: 785.9), 524.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 524.3); Summenformel: C₆₈H₁₀₇N₂₁O₂₂ (MW = 1570.7 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 150 nmol; Ausbeute: 51 nmol (37%, A₂₈₀ = 0.13, V = 100 µL, 15 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet). *Anmerkung: Abspaltung mit in einer wässrigen Lösung von TCEP (0.1 M) und Morpholin (0.4 M) bei 40°C für 12 h.*

30AN: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 770.6$ ((M+2H)²⁺, ber.: 770.9), 514.1 ((M+3H)³⁺, ber.: 514.3); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Summenformel: C₆₇H₁₀₅N₂₁O₂₁ (MW = 1540.7 g·mol⁻¹); Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 72 nmol (37%, A₂₈₀ = 0.18, V = 100 µL, 5 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet). *Anmerkung: Abspaltung mit in einer wässrigen Lösung von TCEP (1.0 M) und Morpholin (4.0 M) bei RT für 24 h.*

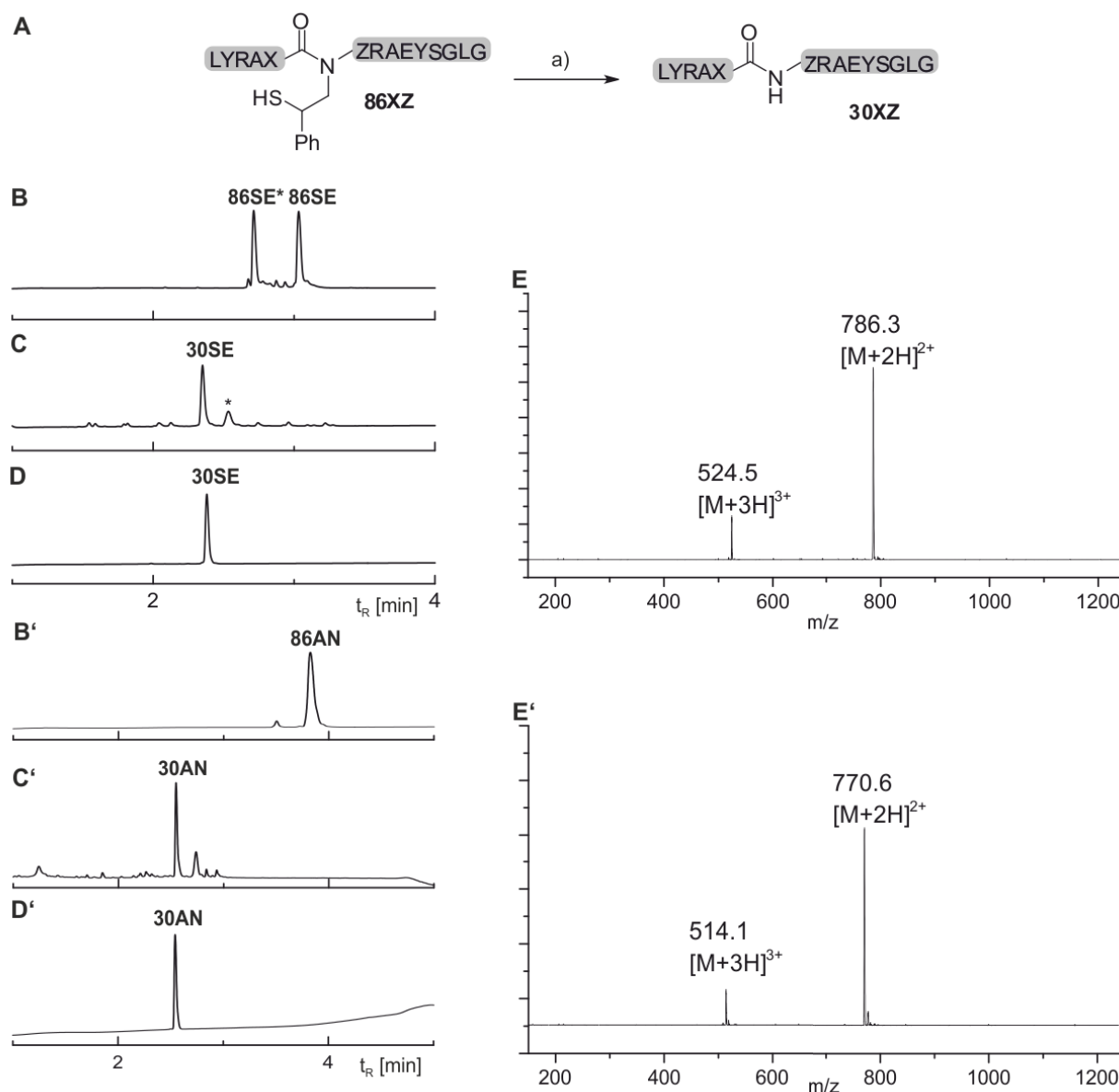


Abbildung 83: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars (A): UPLC-Analysen vor (B/B') und nach (C/C') der Auxiliar-Abspaltung. UPLC-(D/D') und ESI-MS-Analysen (E/E') der gereinigten nativen Peptide. Bedingungen: a) für 86SE: $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 0.1 M TCEP , 0.4 M Morpholin , $\text{pH } 8.5$, 40°C ; 12 h ; für 86AN: $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 1.0 M TCEP , 4.0 M Morpholin , $\text{pH } 8.5$, 40°C , 24 h .

6.12.6. Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation

Die Peptidligationen wurden wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktionen wurden die Auxiliarpeptide **84Z** mit den Peptidthioestern **22X** (1-2 Äq.) in einem wässrigen Ligationpuffer (6 M GuHCl , 20 mM TCEP , $100 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, 3 Vol.-% PhSH , $\text{pH } 7.5$) umgesetzt ($2\text{-}5 \text{ mM}$). Nach der Peptidligation wurde eine wässrige Lösung von TCEP ($0.1\text{-}1.0 \text{ M}$) und Morpholin ($0.4\text{-}4.0 \text{ M}$) zugesetzt und das Reaktionsgemisch bei der angegebenen

Temperatur (rt bis 40°C) geschüttelt (siehe Kapitel 4.2.4, Abbildung 30). Anschließend wurden die native Peptide **30XZ** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

30GG: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 735.0$ ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9), 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉ (MW = 1468.6 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 300 nmol; Ausbeute: 165 nmol (55%, A₂₈₀ = 0.211, V = 200 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84G (0.3 µmol) mit 22G (0.315 µmol); c(84G) = 2 mM; Ligation ohne GuHCl.*

30AG: UPLC-MS: $t_R = 3.0$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 742.1$ ((M+2H)²⁺, ber.: 762.4), 495.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 495.3); Summenformel: C₆₅H₁₀₂N₂₀O₂₀ (MW = 1483.6 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 340 nmol; Ausbeute: 110 nmol (44%, A₂₈₀ = 0.141, V = 200 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84G (0.340 µmol) mit 22A (0.340 µmol); c(84G) = 5 mM.*

30LG: UPLC-MS: $t_R = 3.0$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 763.1$ ((M+2H)²⁺, ber.: 762.9), 509.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 508.9); Summenformel: C₆₈H₁₀₉N₂₁O₁₉ (MW = 1524.7 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 340 nmol; Ausbeute: 110 nmol (44%, A₂₈₀ = 0.141, V = 200 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84G (0.340 µmol) mit 22L (0.374 µmol); c(84G) = 5 mM.*

30GN: UPLC-MS: $t_R = 2.6$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 763.6$ ((M+2H)²⁺, ber.: 763.4), 509.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 509.3); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Summenformel: C₆₆H₁₀₄N₂₂O₂₀ (MW = 1524.7 g·mol⁻¹); Synthesemaßstab: 250 nmol; Ausbeute: 117 nmol (47%, A₂₈₀ = 0.149, V = 200 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84N (0.25 µmol) mit 22G (0.30 µmol); c(84N) = 5 mM.*

30HD: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 804.3$ ((M+2H)²⁺, ber.: 803.9), 536.3 ((M+3H)³⁺, ber.: 536.7); Summenformel: C₇₀H₁₀₇N₂₃O₂₁ (MW = 1606.7 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 250 nmol; Ausbeute: 105 nmol (45%, 15 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet, A₂₈₀ = 0.134, V = 200 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84D (0.250 µmol) mit 22H (0.250 µmol); c(84D) = 5 mM; nach 24 h wurde weiterer Peptidthioester 22H (0.250 µmol, gelöst in 50 µL Ligationspuffer zugesetzt); Auxiliar-Abspaltung mit 650 µL und weiteren 160 µL (Zugabe nach 18 h Auxiliarabspaltung) einer wässrigen Lösung von TCEP (1.0 M) und Morpholin (4.0 M).*

30AR: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 791.7$ ((M+2H)²⁺, ber.: 791.9), 528.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 528.3); Summenformel: C₆₉H₁₁₁N₂₃O₂₀ (MW = 1582.8 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 125 nmol; Ausbeute: 56 nmol (53%, A₂₈₀ = 0.143, V = 100 µL, mit N-Methyl-Peptidspezies LYRAA(Me)RAEYSGLG verunreinigt).
Anmerkung: Reaktion von 84R (0.125 µmol) mit 22A (0.150 µmol); c(84R) = 5 mM.

30FM: UPLC-MS: $t_R = 3.2$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 817.1$ ((M+2H)²⁺, ber.: 816.9), 545.3 ((M+3H)³⁺, ber.: 544.9); Summenformel: C₇₄H₁₁₃N₂₁O₁₉S (MW = 1632.9 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 245 nmol; Ausbeute: 71 nmol (30%; 9 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet, A₂₈₀ = 0.181, V = 100 µL).
Anmerkung: Reaktion von 84M (0.245 µmol) mit 22F (0.306 µmol); c(84M) = 5 mM, Ligation bei 37°C.

Mit Arylpeptidthioester:

30FM: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 817.4$ ((M+2H)²⁺, ber.: 816.9), 545.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 544.9); Summenformel: C₇₂H₁₁₈N₂₄O₁₉ (MW = 1632.9 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 250 nmol; Ausbeute: 65 nmol (37%, 25 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet, A₂₈₀ = 0.215, V = 100 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84M (0.250 µmol) mit 22F_{aryl} (0.375 µmol); c(84M) = 5 mM; nach 8 h wurde weiterer Peptidthioester 22F_{aryl} (0.125 µmol, gelöst in 50 µL Ligationspuffer zugesetzt).*

30LR: UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 812.5$ ((M+2H)²⁺, ber.: 812.5), 542.1 ((M+3H)³⁺, ber.: 542.0); Summenformel: C₇₂H₁₁₈N₂₄O₁₉ (MW = 1623.9 g·mol⁻¹); semi-präparative HPLC-Reinigung: 3-40% B in 30 min; Synthesemaßstab: 200 nmol; Ausbeute: 65 nmol (35%, 12 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet, A₂₈₀ = 0.166, V = 100 µL). *Anmerkung: Reaktion von 84R (0.200 µmol) mit 22L_{aryl} (0.250 µmol); c(84R) = 5 mM, nach 8 h wurde weiterer Peptidthioester 22L_{aryl} (0.1 µmol, gelöst in 30 µL Ligationspuffer zugesetzt), Auxiliar-Abspaltung mit 520 µL und weiteren 100 µL (Zugabe nach 20 h Auxiliarabspaltung) einer wässrigen Lösung von TCEP (1.0 M) und Morpholin (4.0 M).*

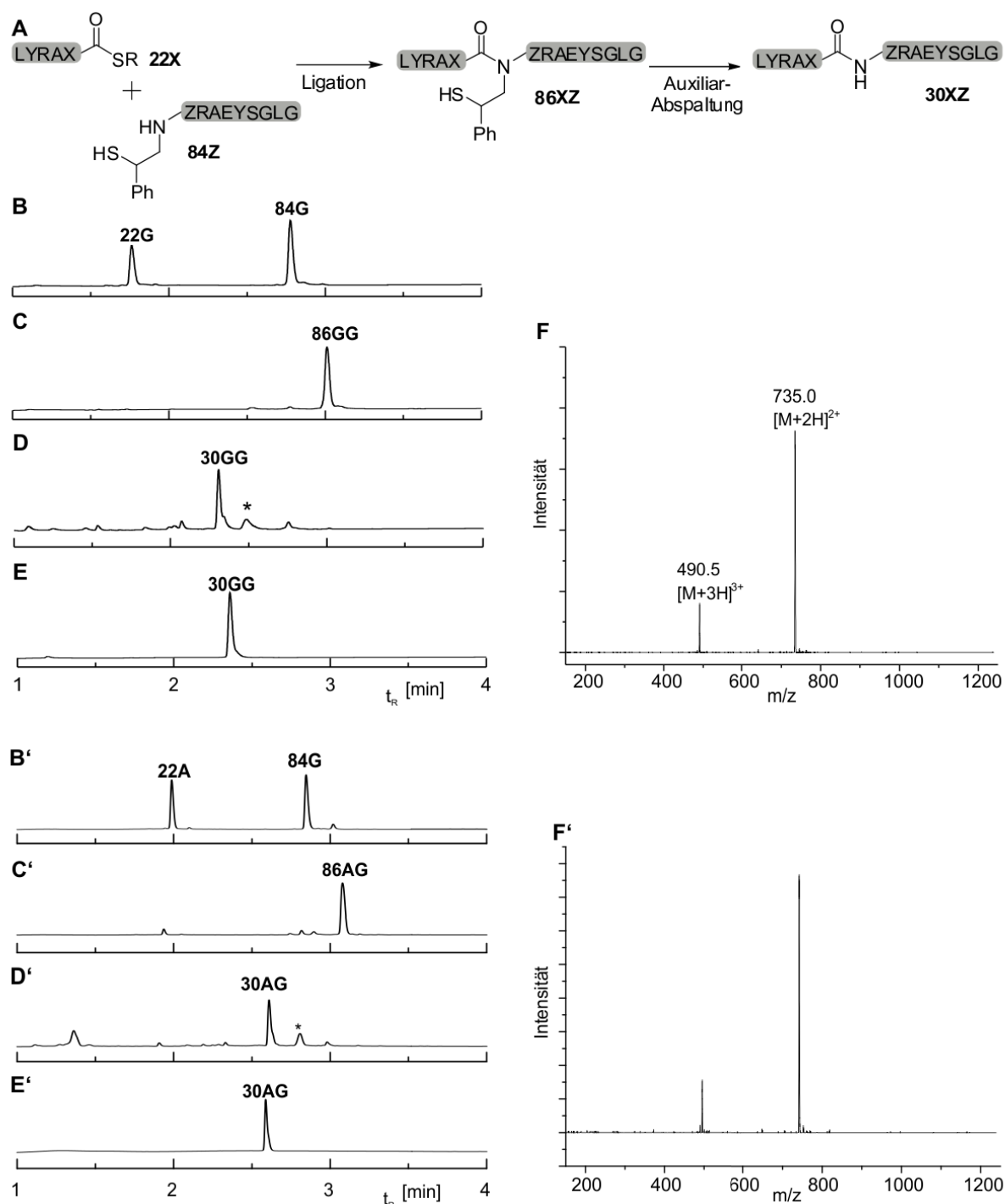


Abbildung 84: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (A): UPLC-Analysen vor (B/B') und nach (C/C') der Peptidligation und nach der Auxiliar-Abspaltung (D/D'). UPLC-(E/E') und ESI-MS-Analysen (F/F') der gereinigten nativen Peptide.

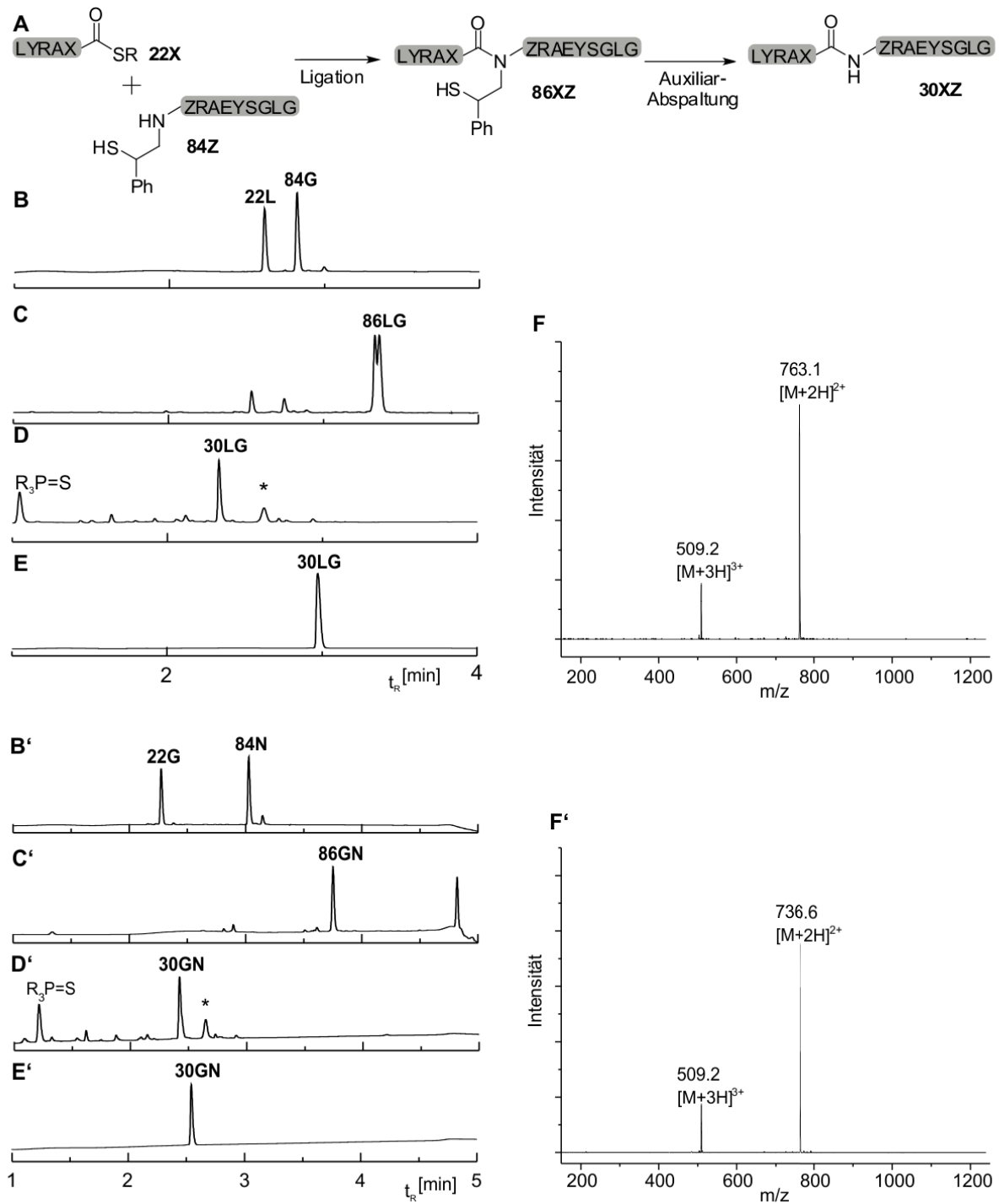


Abbildung 85: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (**A**): UPLC-Analysen vor (**B/B'**) und nach (**C/C'**) der Peptidligation und nach der Auxiliar-Abspaltung (**D/D'**). UPLC-(**E/E'**) und ESI-MS-Analysen (**F/F'**) der gereinigten nativen Peptide.

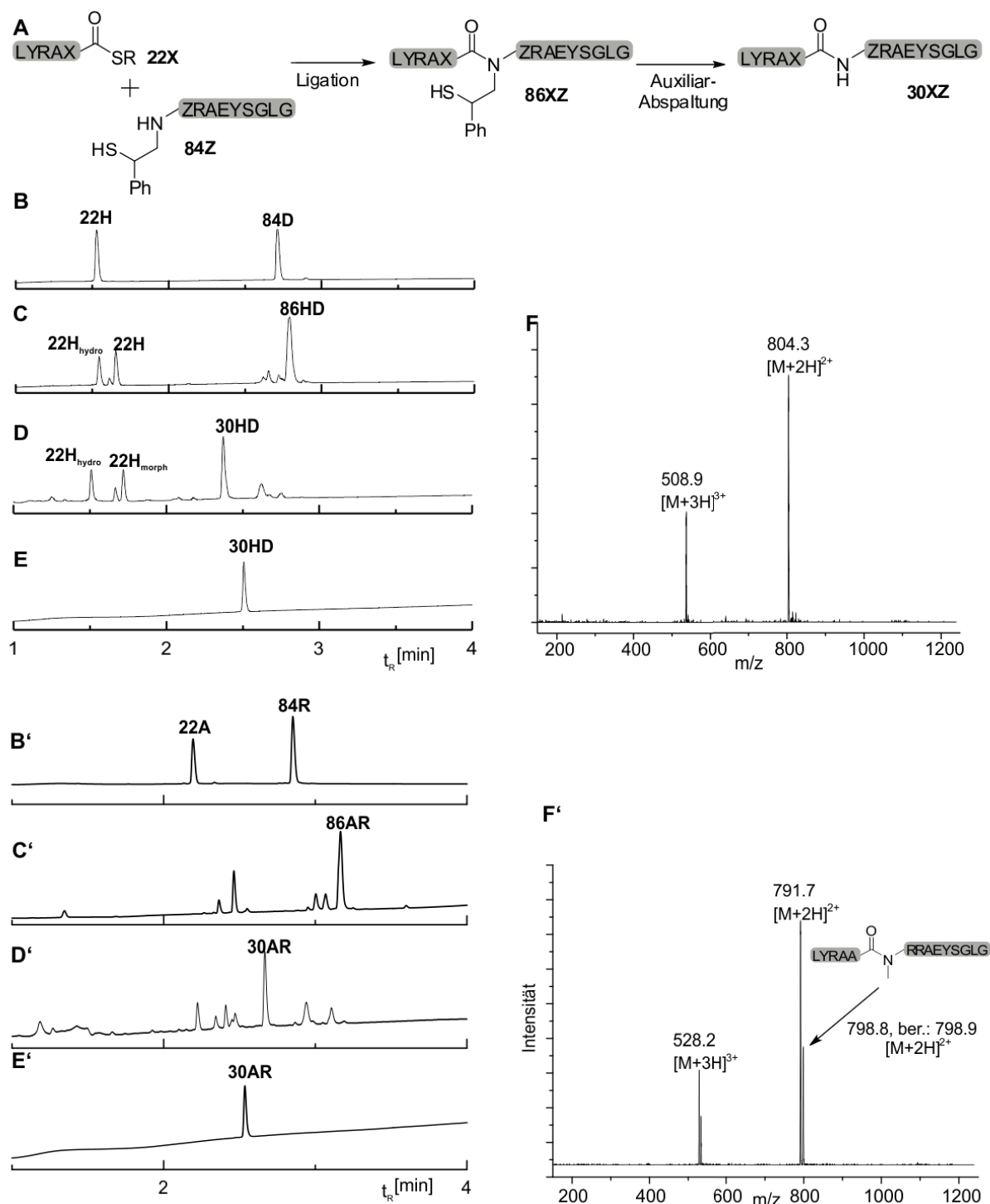


Abbildung 86: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (A): UPLC-Analysen vor (B/B') und nach (C/C') der Peptidligation und nach der Auxiliar-Abspaltung (D/D'). UPLC-(E/E') und ESI-MS-Analysen (F/F') der gereinigten nativen Peptide.

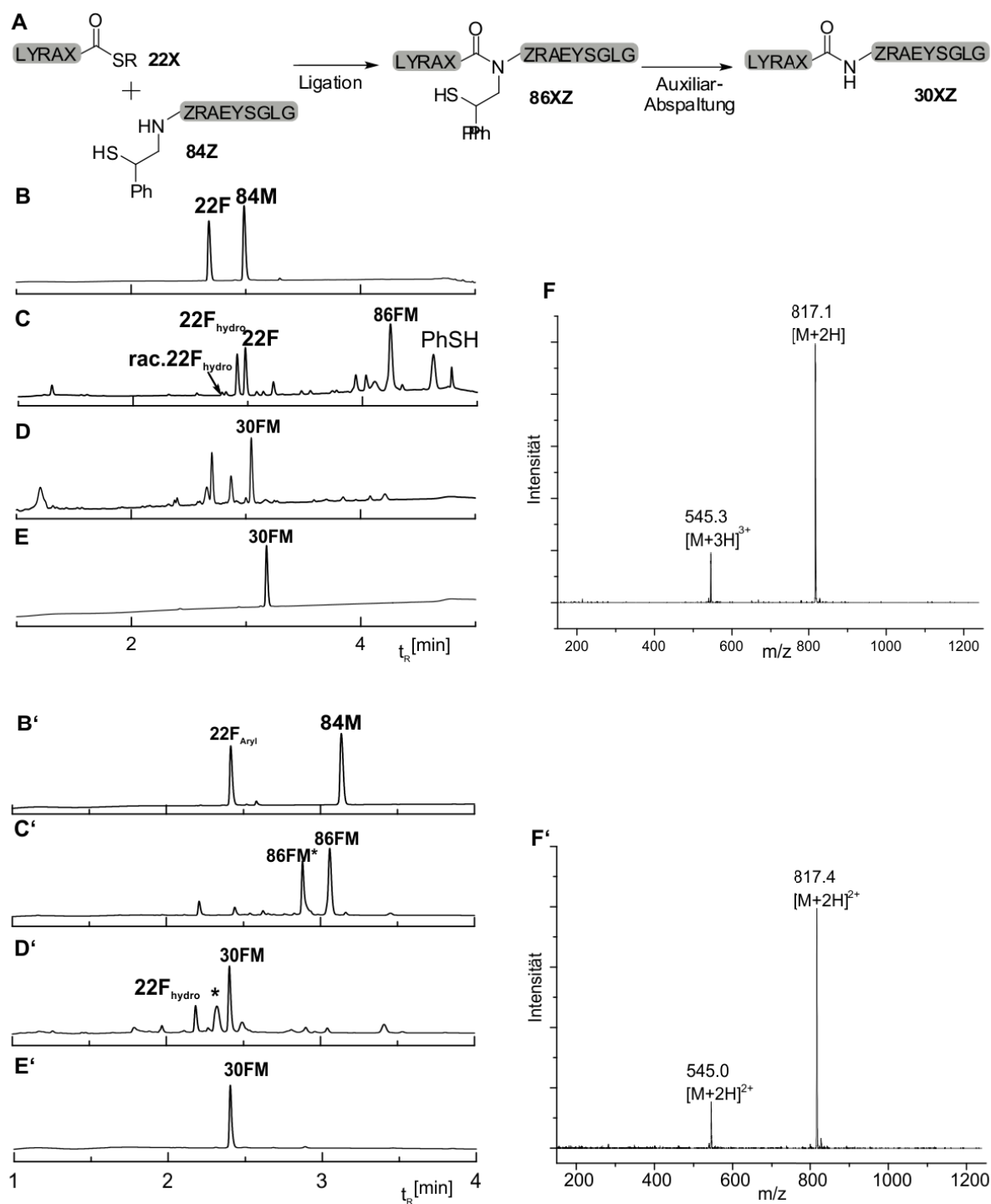


Abbildung 87: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (**A**): UPLC-Analysen vor (**B/B'**) und nach (**C/C'**) der Peptidligation und nach der Auxiliär-Abspaltung (**D/D'**). UPLC-(**E/E'**) und ESI-MS-Analysen (**F/F'**) der gereinigten nativen Peptide.

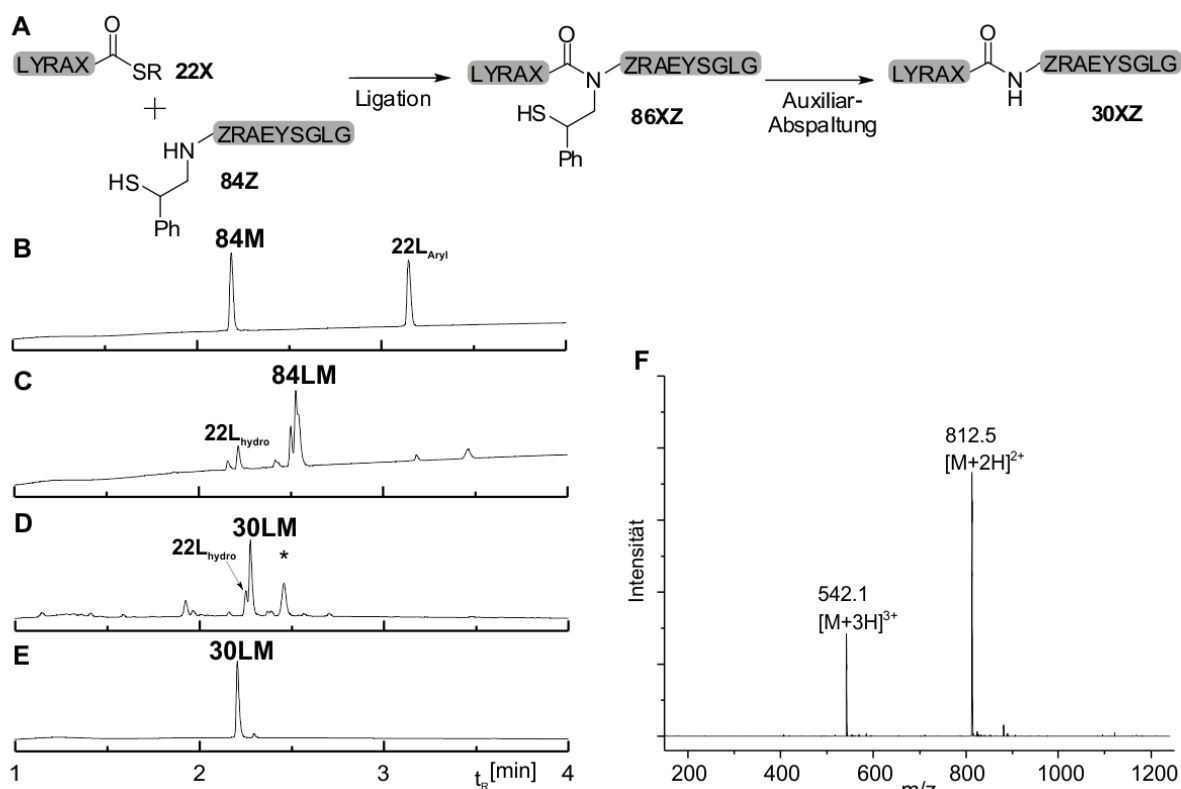


Abbildung 87: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars im direkten Anschluss an die Peptidligation (A): UPLC-Analysen vor (B) und nach (C) der Peptidligation und nach der Auxiliär-Abspaltung (D). UPLC-(E) und ESI-MS-Analysen (F) der gereinigten nativen Peptide.

6.12.7. Anwendung des 2MPE-Auxiliars in der chemischen Synthese antimikrobieller Peptide

C-terminales DCD-1L-Fragment (Auxiliarpeptid 95)

Die Synthese des Auxiliarpeptids **95** erfolgte auf einem Rink-Amid-Harz (automatisierte Fmoc-SPPS, siehe Kapitel 6.4.1., Synthesemaßstab: 4.7 μmol). Die Pseudoprolin-Dipeptide (Fmoc-Asp(OtBu)-Ser(ψMe,Mepro)-OH und Fmoc-Glu(OtBu)-Ser(ψMe,Mepro)-OH) wurden manuell, in Gegenwart von PyBOP/DIPEA in DMF, gekuppelt (Position 31 und 46). Das 2MPE-Auxiliar wurde durch reduktive Aminierung eingeführt. Anschließend wurde das Peptid vom Harz abgespalten und in Diethylether gefällt (siehe Abschnitt 6.4.1.). Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (Gradient: 3-75% B in 30 min) gereinigt. Das gewünschte Auxiliarpeptid (2.46 mg, 603 nmol, 13% (Annahme: 6-faches TFA-Salz)) wurde nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 3.7 min (3-60% B in 4 min); m/z = 1133.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 1133.3), 850.7 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 850.2), 680.8 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 680.4); Summenformel: C₁₅₀H₂₄₉N₃₉O₄₈S (MW = 3398.9 g·mol⁻¹).

N-terminales DCD-1L-Fragment (Peptidthioester 92)

Die Synthese des Peptidthioesters **92** erfolgte auf einem vorbeladenen Fmoc-Gly 2-Chlorotrityl-Harz (automatisierte Fmoc-SPPS, siehe Kapitel 6.4.1., Erstbeladung: 31.9 µmol). Die N-terminale Amino-Funktion wurde durch Behandlung mit Boc₂O in DMF (siehe Kapitel 6.4.1.) geschützt. Anschließend wurde das Peptid als vollständig geschützte Peptidsäure **91** vom polymeren Träger abgespalten, in den Thioester überführt und anschließend die Schutzgruppen entfernt (Kapitel 6.4.1.). Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (Gradient: 3-60% B in 30 min) gereinigt. Der gewünschte Peptidthioester (17.6 mg, 8.29 µmol, 26% (Annahme: 4-faches TFA-Salz) wurde nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 1.9 min (3-60% B in 4 min); m/z = 833.1 ((M+2H)²⁺, ber.: 833.0), 555.9 ((M+3H)³⁺, ber.: 555.6); Summenformel: C₇₄H₁₂₅N₁₉O₂₂S (MW = 1665.0 g·mol⁻¹).

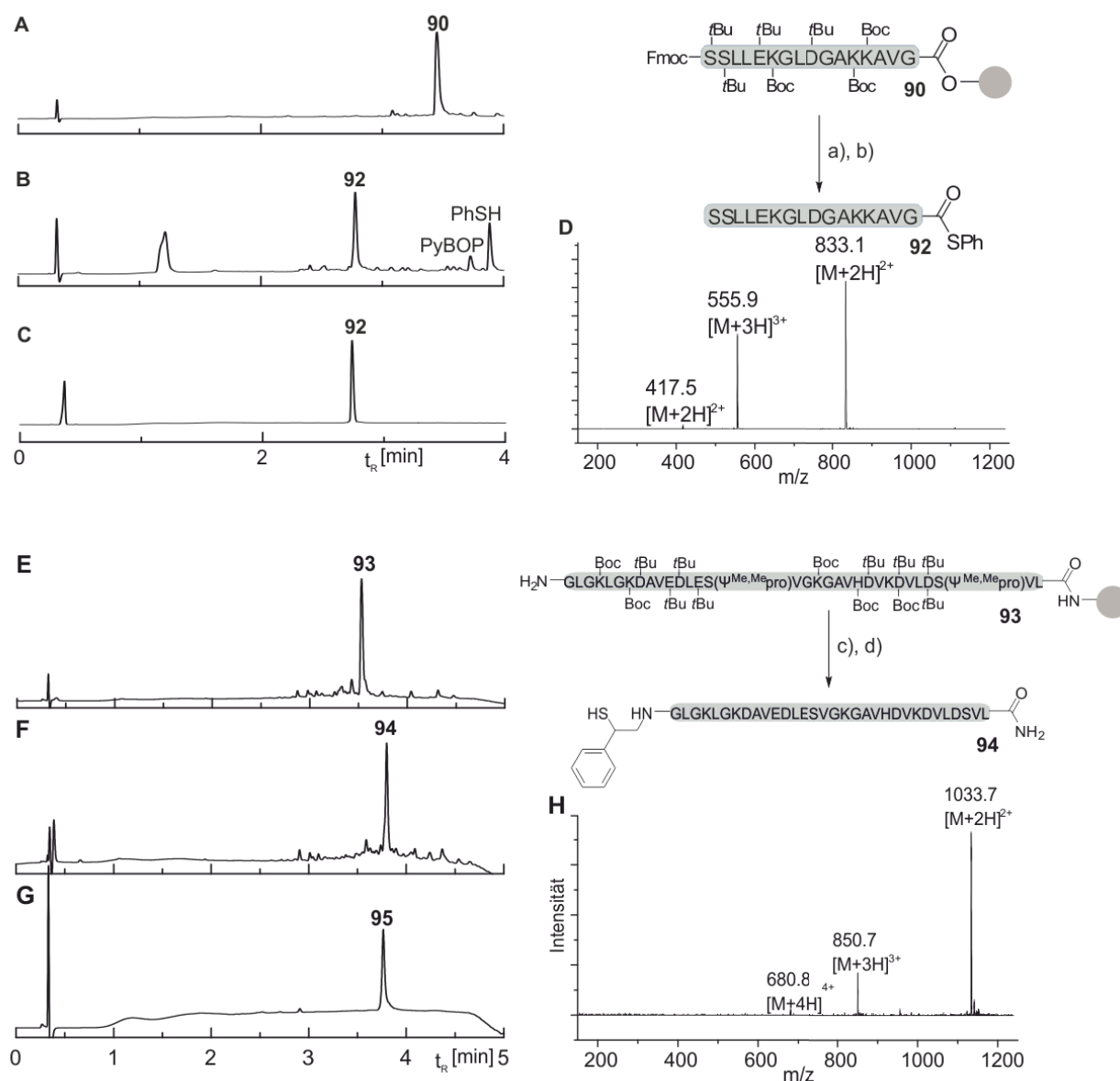


Abbildung 88 : Synthese des N-terminalen DCD-1L Peptidfragments **92**: UPLC-Analyse vor (A) und nach der Thioesterbildung (B). UPLC-(C) und ESI-MS-Analyse (D) des gereinigten Peptidthioesters **92**. Synthese des C-terminalen DCD-1L Peptidfragments **95**: UPLC-Analyse vor (E) und nach der reduktiven Aminierung (F). UPLC-(G) und ESI-MS-Analyse (H) des gereinigten Auxiliar-Peptids **93**. Bedingungen: a) Piperidin, DMF, RT, dann Boc₂O, DIPEA, DMF, RT; b) AcOH, CF₃CH₂OH, CHCl₃, RT; c) PhSH, DIPEA, PyBOP, RT, d) TFA/TIS, RT; e) **83**, NaCNBH₃, AcOH, NMP, iPrOH, RT; f) TFA/TIS, RT.

Synthese von DCD-1L (97)

Peptidthioester **92** (195 nmol) und Auxiliarpeptid **95** (198 nmol) wurden vereint (aus Stammlösungen) und gefriergetrocknet. Die Peptidfragmente wurden unter Argon-Atmosphäre in 119 μL Ligationspuffer (100 mM Na_2HPO_4 , 20 mM TCEP, pH = 7.5) gelöst. Nach 90 Min wurden 721 μL einer wässrigen Lösung von TCEP (0.3 M) und Morpholin (1.2 M) zugegeben (zur Abspaltung des Auxiliars) und das Reaktionsgemisch auf 40 °C erhitzt. Nach zehn Stunden wurde das native Peptid durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC-Reinigung (3-60% B in 30 min) isoliert. Durch anschließende Gefriertrocknung wurde DCD-1L (**97**) (70 mg, 120 nmol, 66% (Annahme: 9-faches TFA-Salz), 17 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 3.8 min (3-60% B in 4 min); m/z = 1205.3 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 1205.2 (100%)), 964.5 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 964.4 (100%)), 803.9 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 803.8 (100%)), 689.4 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 689.1 (100%)), 603.6 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 603.1 (100%)); Summenformel: $\text{C}_{210}\text{H}_{360}\text{N}_{58}\text{O}_{70}$ (MW = 4817.4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

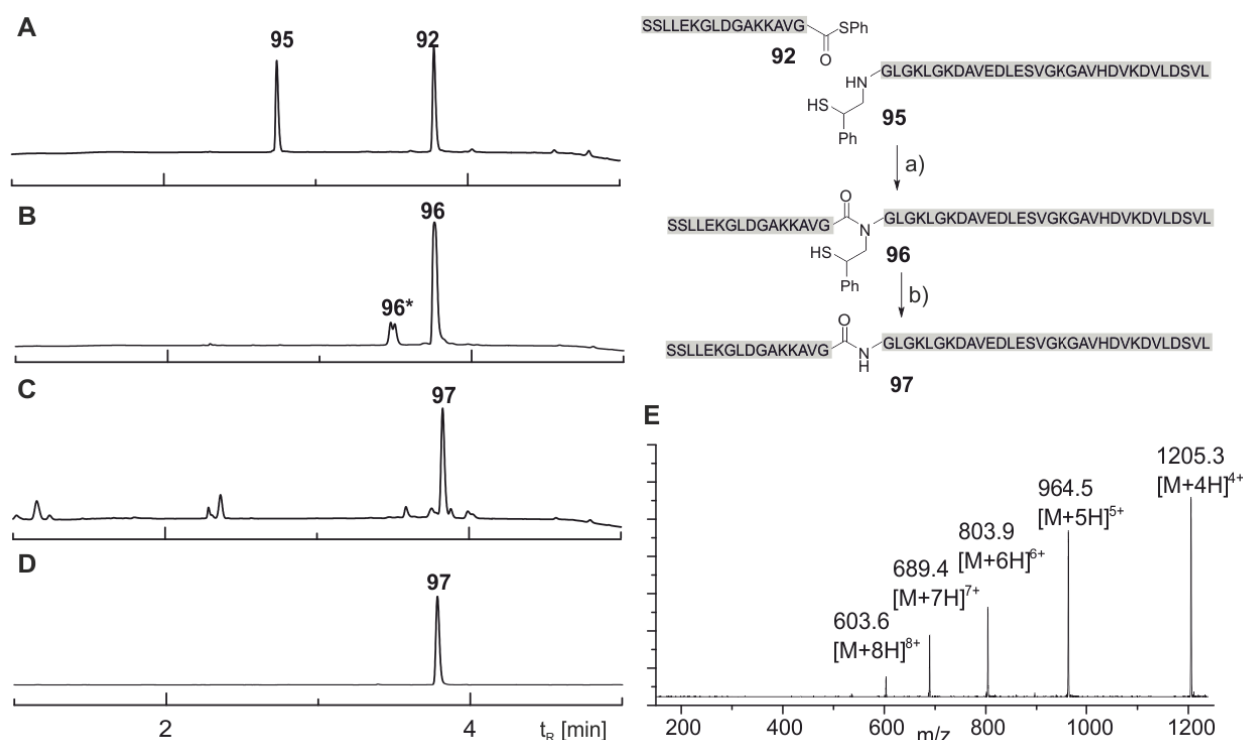


Abbildung 89: Synthese von DCD-1L (**97**) durch Auxiliar-vermittelte Peptidligation: UPLC-Analyse vor (A) und nach (B) der Ligation und nach der Auxiliar-Abspaltung (C). UPLC-(D) und ESI-MS-Analyse (E) und des gereinigten DCD-1L Peptids (**97**). Bedingungen: a) $c(\text{Peptid}) = 1.66 \text{ mM}$, 20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5; b) $c(\text{Peptid}) = 0.25 \text{ mM}$, 0.3 M TCEP, 1.2 M Morpholin, 40°C.

C-terminales OP-2-Fragment (Auxiliarpeptid 100)

Die Synthese des Auxiliarpeptids **100** erfolgte auf einem Rink-Amid-Harz (automatisierte Fmoc-SPPS, siehe Kapitel 6.4.1., Synthesemaßstab: 70.0 μmol). Das Pseudoprolin-Dipeptid (Fmoc-Asn(Trt)-Thr(psiMe,Mepro)-OH) wurde manuell, in Gegenwart von PyBOP/DIPEA in DMF, gekuppelt (Position 25). Das 2MPE-Auxiliar wurde durch reduktive Aminierung eingeführt. Anschließend wurde das Peptid vom Harz abgespalten und in Diethylether gefällt (siehe Abschnitt 6.4.1.). Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (Gradient: 3-50% B in 30 min) gereinigt. Das gewünschte Auxiliarpeptid (58.3 mg, 16.4 μmol , 23% (Annahme: 5-faches TFA-Salz)) wurde nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 2.7 min (3-60% B in 4 min); m/z = 993.1 ((M+3H)³⁺, ber.: 992.5), 745.6 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 744.7), 596.8 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 595.3); Summenformel: C₁₃₄H₂₁₉N₃₅O₃₉S (MW = 2976.4 g·mol⁻¹).

N-terminales OP-2-Fragment (Peptidthioester 106)

Die Synthese des Peptidthioesters **106** erfolgte auf einem vorbeladenen Fmoc-Ser(*t*Bu) 2-Chlorotrityl-Harz (automatisierte Fmoc-SPPS, siehe Kapitel 6.4.1., Erstbeladung: 50.0 μmol). Der N-terminale Glycin-Rest wurde durch Verwendung von Boc-Gly-OH eingeführt. Anschließend wurde das Peptid als vollständig geschützte Peptidsäure vom polymeren Träger abgespalten, in den Thioester überführt und anschließend die Schutzgruppen entfernt (Kapitel 6.4.1). Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC (Gradient: 3-60% B in 30 min) gereinigt. Der gewünschte Peptidthioester (18.9 μmol , 38%; A₂₈₀ = 0.645, V = 50.0 mL) wurde nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 3.4 min (3-60% B in 4 min); m/z = 1070.7 ((M+2H)²⁺, ber.: 1070.1), 714.3 ((M+3H)³⁺, ber.: 713.9), 536.2 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 535.5); Summenformel: C₁₀₃H₁₅₁N₂₅O₂₃S (MW = 2139.5 g·mol⁻¹).

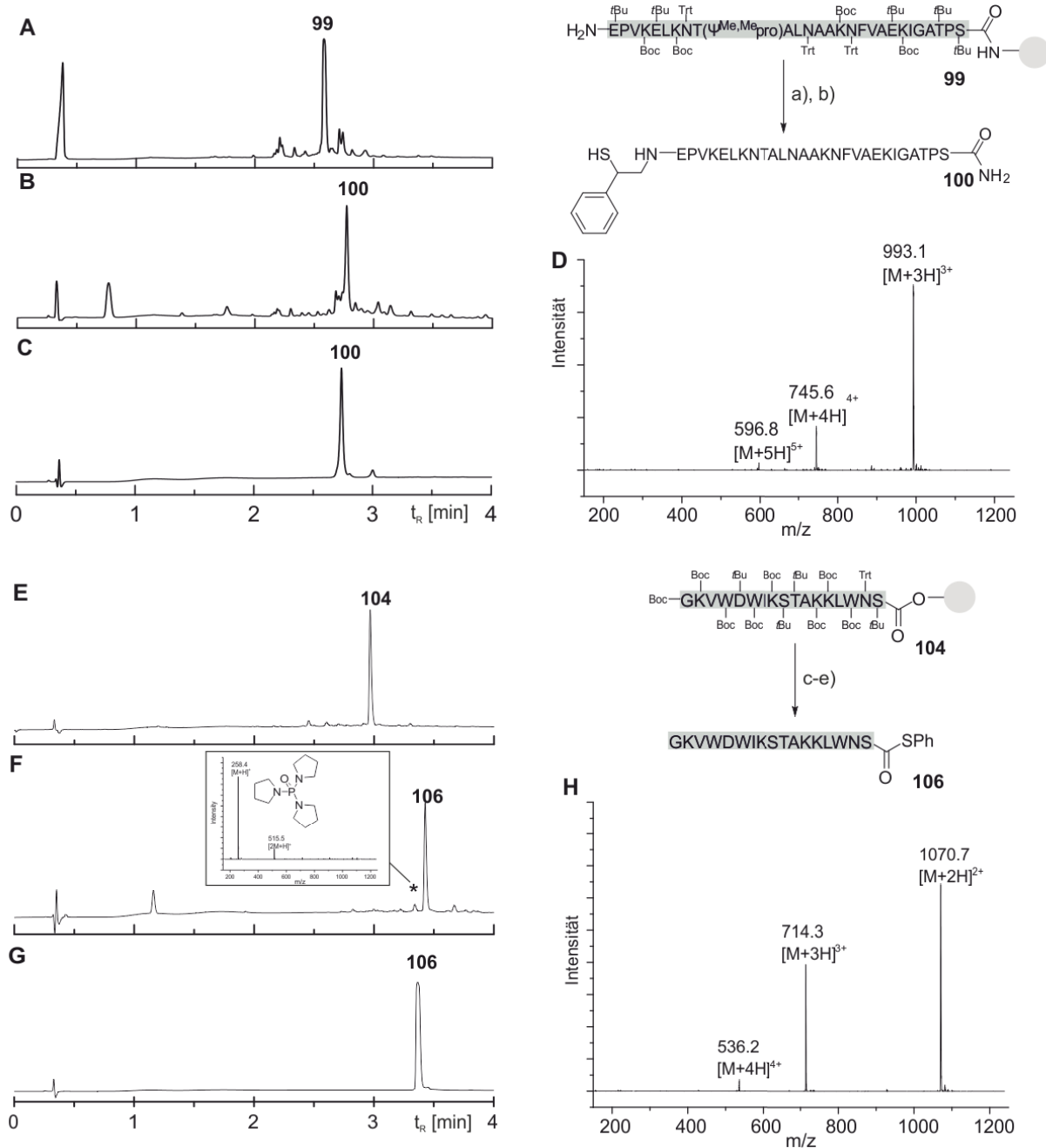


Abbildung 90: Synthese des C-terminalen OP-2-Peptidfragments **100**: UPLC-Analyse vor (A) und nach der reduktiven Aminierung (B). UPLC-(C) und ESI-MS-Analyse (D) des gereinigten Auxiliar-Peptides **100**. Synthese des N-terminalen OP-2 Peptidfragments **106**: UPLC-Analyse vor (E) und nach der Thioesterbildung (F). UPLC-(G) und ESI-MS-Analyse (H) des gereinigten Peptidthioesters **92**. Bedingungen: a) **83**, NaCNBH₃, AcOH, NMP, iPrOH, RT; b) TFA/TIS, RT. c) AcOH, CF₃CH₂OH, CHCl₃, RT; d) PhSH, DIPEA, PyBOP, -25°C, e) TFA/TIS, RT;

Synthese des Ligationsproduktes 103

Peptidthioester **106** (160 nmol) und Auxiliarpeptid **100** (240 nmol) wurden vereint (aus Stammlösungen) und gefriergetrocknet. Die Peptidfragmente wurden unter Argon-Atmosphäre in 40 μ L Ligationspuffer (6M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, 20 mM TCEP, pH = 6.8) gelöst. Nach zehn Stunden wurden 5 μ L einer wässrigen 2M-NaOH-Lösung zugegeben, um das S- und N-acetylierte Ligationprodukt **103*** zu hydrolysieren. Anschließend wurde das Ligationprodukt **103** (59 nmol, 41%, A_{280} = 0.202, V = 500 μ L, 15 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet) durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC-Reinigung (3-60% B in 30 min) isoliert und nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 4.6 min (3-60% B in 4 min); m/z = 1002.5 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 1001.9 (100%)), 835.6 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 835.1 (100%)), 716.1 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 716.1 (100%)); Summenformel: C₂₃₁H₃₆₄N₆₀O₆₂ (MW = 5005.8 g·mol⁻¹).

Auxiliar-Abspaltung am gereinigten Ligationprodukt 103

Das gefriergetrocknete Ligationprodukt **103** (55 nmol) wurde in 40 μ L einer wässrigen Lösung von 0.3 M TCEP und 1.2 M Morpholin gelöst und bei 40°C geschüttelt. Nach drei Stunden wurde OP-2 **107** (28 nmol, 57%, A_{280} = 0.192, V = 250 μ L, 6 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet) durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC-Reinigung (3-60% B in 30 min) isoliert und nach der Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 4.7 min (3-60% B in 4 min); m/z = 1218.2 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 1218.2 (100%)), 975.1 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 974.7 (100%)), 812.8 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 812.5 (100%)), 696.8 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 696.5 (100%)), 609.9 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 609.6 (100%)); Summenformel: C₂₂₃H₃₅₆N₆₀O₆₂ (MW = 4869.6 g·mol⁻¹).

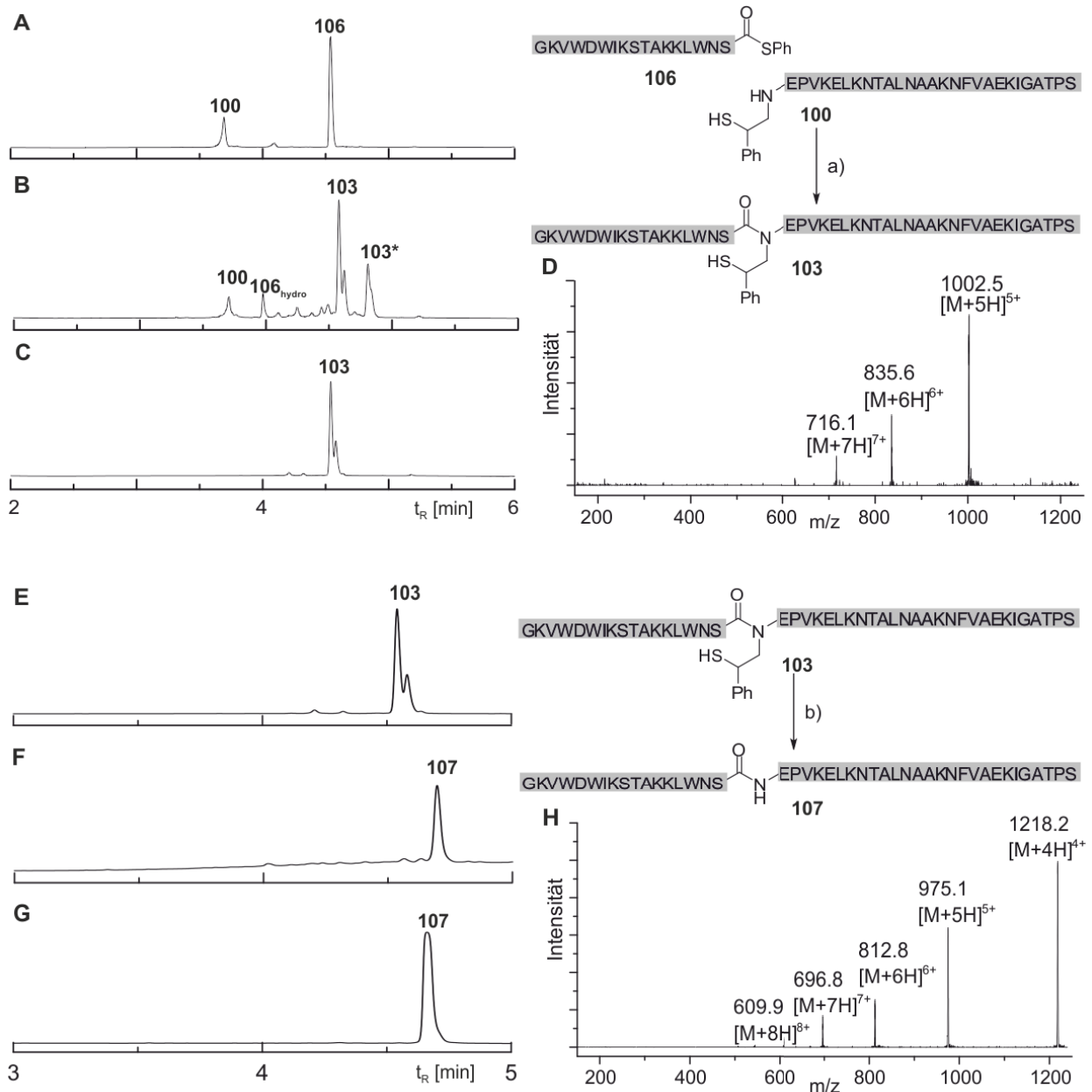


Abbildung 91: Synthese von Opistoparin-2 (**107**) durch Auxiliar-vermittelte Peptidligation: UPLC-Analyse vor (**A**) und nach (**B**) der Ligation. UPLC-(**C**) und ESI-MS-Analyse (**D**) des gereinigten Ligationsproduktes **103**. UPLC-Analyse vor (**E**) und nach (**F**) der Auxiliar-Abspaltung. UPLC-(**G**) und ESI-MS-Analyse (**H**) des gereinigten Opistoparin-2 **107** Bedingungen: a) $c(\text{Thioester}) = 4 \text{ mM}$, 20 mM TCEP , $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $\text{pH } 6.8$, RT , 10 h ; b) $c(\text{Peptid}) = 0.125 \text{ mM}$, 0.3 M TCEP , 1.2 M Morpholin , $\text{pH } 8.5$, 40°C , 3 h .

Synthese von Opistoporin-2 (107) durch Auxiliar-Abspaltung im direkten Anschluss an die Peptidligation

Peptidthioester **106** (160 nmol) und Auxiliarpeptid **106** (320 nmol) wurden in 40 μ L Ligationspuffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, 20 mM TCEP, pH = 6.8) gelöst. Nach 12 h wurden 600 μ L einer wässrigen Lösung von 0.3 M TCEP und 1.2 M Morpholin zugegeben (zur Abspaltung des Auxiliars) und das Reaktionsgemisch auf 40 °C erhitzt. Nach 12 h wurde das native Peptid **107** durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC-Reinigung (3-60% B in 30 min) isoliert. Durch anschließende Gefriertrocknung wurde OP-2 (**107**) (31 nmol, 21%, A₂₈₀ = 0.212, V = 250 μ L, 15 nmol wurden für intermediäre Analyse verwendet) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: t_R = 4.6 min (3-60% B in 4 min); m/z = 1218.3 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 1218.2 (100%)), 975.0 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 974.7 (100%)), 812.8 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 812.5 (100%)); Summenformel: C₂₂₃H₃₅₆N₆₀O₆₂ (MW = 4869.6 g·mol⁻¹).

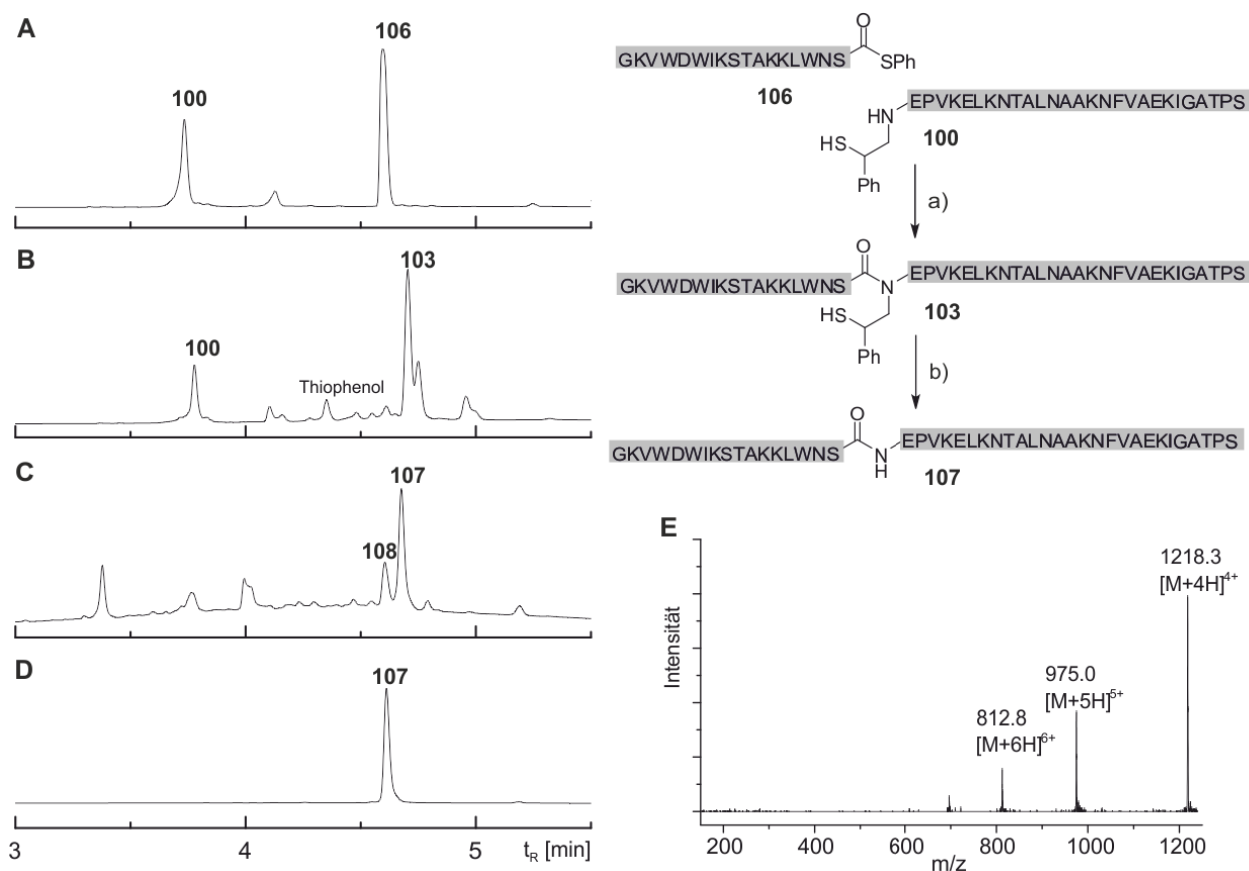


Abbildung 92: Synthese von Opistoporin-2 (**107**) durch Auxiliar-vermittelte Peptidligation: UPLC-Analyse vor (**A**) und nach (**B**) der Ligation und nach der Auxiliar-Abspaltung (**C**). UPLC- (**D**) und ESI-MS-Analyse (**E**) des gereinigten Opistoporin-2 **107**. Bedingungen: a) $c(\text{Thioester}) = 4 \text{ mM}$, 20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, pH 6.8, RT, 10 h; b) $c(\text{Peptid}) = 0.125 \text{ mM}$, 0.3 M TCEP, 1.2 M Morpholin, pH 8.5, 40°C, 3 h.

6.12.8. Grenzen des 2MPE-Auxiliars und Abspaltung in Gegenwart von Cystein-Resten

Ligation an Val-Asn-Verknüpfungsstelle

Die Peptidligation wurde wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktion wurde das Auxiliarpeptid **84N** (200 nmol) mit dem Peptidthioester **22V** (240 nmol) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2 mM). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt.

86VN*: UPLC-MS: t_R = 2.9 min (3-40% B in 4 min); m/z = 852.8 (C₇₇H₁₁₉N₂₁O₂₁S (M+2H)²⁺, ber.: 852.4); 568.8 (C₇₇H₁₂₀N₂₁O₂₁S (M+3H)³⁺, ber.: 568.6); C₇₇H₁₁₇N₂₁O₂₁S (MW = 1604.9 g·mol⁻¹).

Studie mit ungeschützten Cys-Rest

Die Peptidligation wurde wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktion wurde das Auxiliarpeptid **109** (250 nmol) mit dem Peptidthioester **22G** (250 nmol) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2 mM). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt. Zur Abspaltung des 2MPE-Auxiliars wurde nach zwei Stunden eine wässrige Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) zugesetzt (Peptidkonzentration = 0.5 mM). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt.

110: UPLC-MS: t_R = 3.1 min (3-40% B in 4 min); m/z = 826.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 825.9), 551.4 ((M+3H)³⁺, ber.: 550.9); Summenformel: C₇₃H₁₁₁N₂₁O₁₉S₂ (MW = 1650.9 g·mol⁻¹).

113: UPLC-MS: t_R = 2.6 min (3-40% B in 4 min); m/z = 758.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 757.9), 505.9 ((M+3H)³⁺, ber.: 505.6); Summenformel: C₆₅H₁₀₃N₂₁O₁₉S (MW = 1514.7 g·mol⁻¹).

111: UPLC-MS: t_R = 2.4 min (3-40% B in 4 min); m/z = 742.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 741.9), 495.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 494.9); Summenformel: C₆₅H₁₀₃N₂₁O₁₉ (MW = 1482.7 g·mol⁻¹).

112: UPLC-MS: t_R = 2.4 min (3-40% B in 4 min); m/z = 706.8 ((M+2H)²⁺, ber.: 706.4), 471.6 ((M+3H)³⁺, ber.: 471.3); Summenformel: C₆₂H₉₈N₂₀O₁₈ (MW = 1411.6 g·mol⁻¹).

Studie mit Phacm-geschützten Cys-Rest

Die Peptidligation wurde wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktion wurde das Auxiliarpeptid **114** (250 nmol) mit dem Peptidthioester **22G** (250 nmol) in einem wässrigen Ligationspuffer (6M GuHCl, 20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2 mM). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt. Nach zwei Stunden wurde eine wässrige Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) zugesetzt (Peptidkonzentration = 0.5 mM). Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt. *Anmerkung: Die Zugabe von GuHCl war notwendig, um das Auxiliarpeptid **114** zu vollständig zu lösen.*

115: UPLC-MS: $t_R = 2.8$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 900.1$ ((M+2H)²⁺, ber.: 899.4), 600.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 600.0); Summenformel: C₈₂H₁₂₀N₂₂O₂₀S₂ (MW = 1798.1 g·mol⁻¹).

116: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 832.0$ ((M+2H)²⁺, ber.: 831.4), 555.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 554.6); Summenformel: C₇₄H₁₁₂N₂₂O₂₀S (MW = 1514.7 g·mol⁻¹).

6.12.9. Mechanistische Untersuchungen der Auxiliar-Abspaltungsreaktion

Auxiliar-Abspaltung mit TEMPO

In Gegenwart des Radikalfängers TEMPO wurde keine Auxiliar-Abspaltung beobachtet.

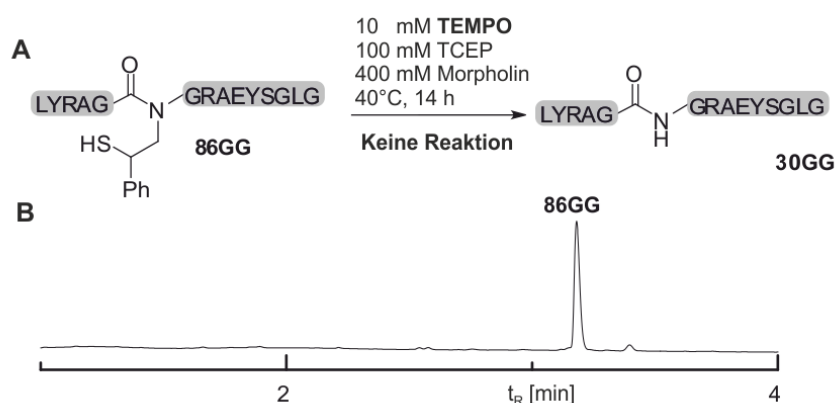


Abbildung 93: Abspaltung des 2MPE-Auxiliars in Gegenwart von TEMPO (A): UPLC-Analyse (B) der Auxiliar-Abspaltungsreaktion nach 14 h. Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 0.5$ mM.

Synthese des ^{13}C -markierten Auxiliar-Vorläufermoleküls 128:

Die Darstellung des ^{13}C -markierten S-Dmt-geschützten Aldehyds **128** ausgehend von ^{13}C -markierter Phenylelessigsäure ($\alpha,\beta\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Phenylelessigsäure) erfolgte nach bekannter Synthesevorschrift (Kapitel 6.12.1, analog zu Aldehyd **83**).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 9.19-8.76 (dd, J_1 = 4.0 Hz ($^3\text{J}(\text{HH})$); J_2 = 25.5 Hz ($^2\text{J}(\text{CH})$), J_3 = 184 Hz ($^1\text{J}(\text{CH})$), 1H), 7.33-7.32 (m, 2H), 7.24-7.16 (m, 10H), 7.04-7.01 (m, 2H), 6.72-6.69 (m, 4H), 4.07-3.77 (J_1 = 3.5 Hz ($^3\text{J}(\text{HH})$); J_2 = 140 Hz ($^1\text{J}(\text{CH})$), 3.70 (d, J = 1.5 Hz, 6H).

Synthese des ^{13}C -markierten Ligationsprodukt 130:

Das Auxiliarpeptid **129** wurde durch reduktive Aminierung des ^{13}C -markierten S-Dmt-geschützten Aldehyds **128** mit dem Harz-gebundenen Glycinmodelpeptid **58G** als Rohprodukt erhalten. Davon wurden ca. 5.0 μmol des Rohproduktes mit dem Glycinpeptidthioester **22G** (4.80 μmol) umgesetzt. Dazu wurden die gefriergetrockneten Peptide in 2.0 mL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 200 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH) suspendiert und durch Zugabe von 0.5 mL ACN vollständig gelöst. Nach zwei Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 μL TFA gestoppt und das Reaktionsgemisch mittels präparativer HPLC gereinigt (Gradient: 3-45% B in 30 min). Das gefriergetrocknete Produkt (3.83 μmol , 79% Ausbeute, A_{280} = 0.996, 1.0 mL) wurde als weißer Feststoff erhalten.

129: UPLC-MS: t_R = 3.3 min (3-40% B in 4 min); m/z = 1046.6 ($(\text{M}+\text{H})^+$, ber.: 1046.5), 523.9 ($(\text{M}+2\text{H})^{2+}$, ber.: 523.8); Summenformel: $\text{C}_{44}^{13}\text{C}_2\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_{13}\text{S}$ (MW = 1046.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

130: UPLC-MS: t_R = 3.0 min (3-40% B in 4 min); m/z = 804.2 ($(\text{M}+2\text{H})^{2+}$, ber.: 803.9), 536.7 ($(\text{M}+3\text{H})^{3+}$, ber.: 536.6); Summenformel: $\text{C}_{70}^{13}\text{C}_2\text{H}_{109}\text{N}_{21}\text{O}_{19}\text{S}$ (MW = 1606.8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

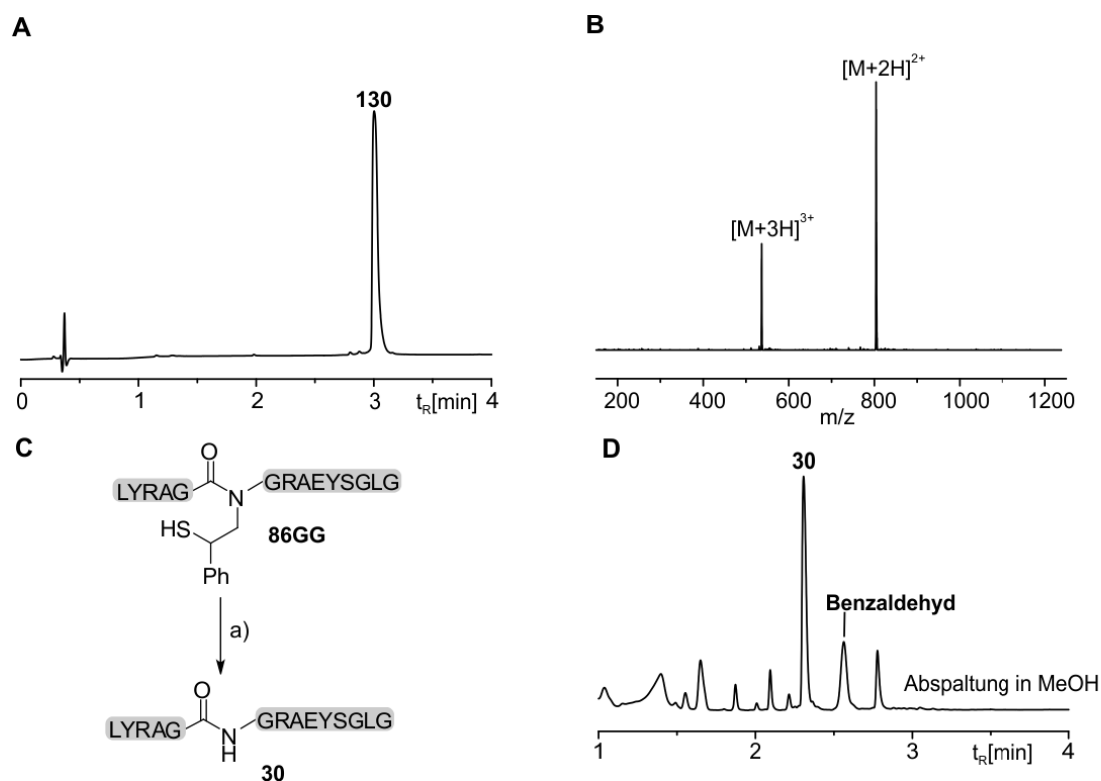


Abbildung 94: UPLC-(A) und ESI-MS-Analyse (B) des ^{13}C -markierten Ligationsproduktes **130**. Auxiliär-Abspaltung in Methanol (C): UPLC-Analyse der Auxiliär-Abspaltung nach 24 h (D). Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 0.5 \text{ mM}$, 0.4 M TCEP , 1.2 M Morpholin , MeOH, RT.

NMR-spektroskopische Untersuchung

Auxiliär-Abspaltungen für die NMR-Experimente

Das Ligationsprodukt **86GG** (350 nmol) wurde in 700 μL einer D_2O -Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) gelöst und anschließend 24 h bei 40°C geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde vor und nach der Reaktion mit Hilfe der UPLC- und NMR-Analyse charakterisiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit CDCl_3 extrahiert ($3 \times 200 \mu\text{L}$) und die organische Phase über MgSO_4 getrocknet. Die erhaltene wässrige und organische Phase wurden mit Hilfe der UPLC- und NMR-Analyse untersucht.

Das ^{13}C -markierte Ligationsprodukt **130** (300 nmol) wurde in 600 μL einer wässrigen Lösung ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 95/5, v/v, pH 8.5) von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) gelöst und anschließend 24 h bei RT geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde vor und nach der Reaktion mit Hilfe der UPLC- und NMR-Analyse charakterisiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit

CDCl₃ extrahiert (3 x 200 µL) und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Die erhaltene wässrige und organische Phase wurden mit Hilfe der UPLC- und NMR-Analyse untersucht.

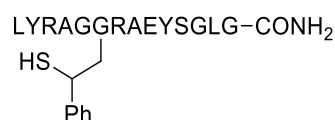
Um eine eindeutige Zuordnung der Verbindungen in Tabelle 3 zu ermöglichen, erfolgte die Charakterisierung der Referenzsubstanzen bei einer Konzentration von 10 mM (*N*-Formyl-GRAEYSGLG (**133**)) oder 50 mM (Ameisensäure (**131**), *N*-Formyl-Morpholin (**132**)) in einer wässrigen Lösung (H₂O/D₂O, 95/5, v/v, pH 8.5) aus TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M). Alle Proben wurden durch Zugabe von 1M NaOH auf pH 8.5 eingestellt. Für wässrige Proben diente das HOD-Signal (¹H-NMR: δ = 4.71 ppm) oder das Morpholin-Signal (¹³C-NMR: δ = 63.8 ppm) als interner Standard. Für HSQC-Analyse von Benzaldehyd in CDCl₃ wurde die Referenzsubstanz bei 50 mM Konzentration in Gegenwart von 50 mM Morpholin vermessen und das Morpholin-Signal (¹H-NMR: δ = 3.71 ppm; ¹³C-NMR: δ = 68.0 ppm) als interner Standard verwendet.

	HSQC-Analyse			
	¹ H-NMR-Signale		¹³ C-NMR-Signale	
	Gefunden	Referenz	Gefunden	Referenz
Ameisensäure (131)	8.30	8.30	170.80	170.80
<i>N</i> -Formylmorpholin (132)	7.88	7.87	163.30	163.30
<i>N</i> -Formyl-GRAEYSGLG (133)	8.04	8.04	164.90	164.90
Benzaldehyd (134)	10.05	10.05	192.40	192.40

Tabelle 3: Chemische Verschiebungen [in ppm] identifizierter Produkte der 2MPE-Auxiliar-Abspaltung.

6.12.10. Ergänzende Analytik zu Kapitel 4.2

85



HPLC-MS: t_R = 14.0 min 3-45% B in 20 min; 1058.2 ((M+H)⁺, ber.: 1058.5), 530.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 529.8); Summenformel: C₄₇H₇₁N₁₃O₁₃S.

87



UPLC-MS: t_R = 2.4 min 3-40% B in 4 min; 742.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 741.9), 495.4 ((M+3H)³⁺, ber.: 494.9); Summenformel: C₆₅H₁₀₃N₂₁O₁₉.




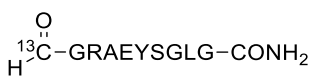

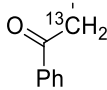
88	LYRAGGRAEYSGLG-CONH ₂ 	UPLC-MS: t _R = 2.8 min 3-40% B in 4 min; 794.2 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 793.9), 530.4 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 529.6); Summenformel: C ₇₂ H ₁₀₆ N ₂₀ O ₂₁ .
30QF	LYRAQFRAEYSGLG-CONH ₂	UPLC-MS: t _R = 2.8 min 3-40% B in 4 min; 815.8 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 815.9), 544.2 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 544.3); Summenformel: C ₇₄ H ₁₁₁ N ₂₁ O ₂₁ .
89QF	LYRAQFRAEYSGLG-CONH ₂ 	UPLC-MS: t _R = 3.2 min 3-40% B in 4 min; 829.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 829.9), 553.9 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 553.6); Summenformel: C ₇₅ H ₁₁₁ N ₂₁ O ₂₂ .
89AN	LYRAANRAEYSGLG-CONH ₂ 	UPLC-MS: t _R = 2.9 min 3-40% B in 4 min; 784.6 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 784.9), 523.9 ((M+3H) ³⁺ , ber.: 523.6); Summenformel: C ₆₈ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₂₂ .
133		UPLC-MS: t _R = 2.0 min 3-40% B in 4 min; 937.5 ((M+H) ⁺ , ber.: 937.5); Summenformel: C ₃₈ ¹³ CH ₆₁ N ₁₃ O ₁₄ .
135	LYRAGGRAEYSGLG-CONH ₂ 	UPLC-MS: t _R = 2.2 min 3-40% B in 4 min; 742.9 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 742.4); Summenformel: C ₆₄ ¹³ CH ₁₀₃ N ₂₁ O ₁₉ .
136	LYRAGGRAEYSGLG-CONH ₂ 	UPLC-MS: t _R = 2.7 min 3-40% B in 4 min; 795.4 ((M+2H) ²⁺ , ber.: 794.9); Summenformel: C ₇₀ ¹³ C ₂ H ₁₀₇ N ₂₁ O ₂₀ .

Tabelle 4: Analytische Daten ausgewählter Verbindungen aus Kapitel 4.2.

6.13. Synthese und Anwendung des 2ME-Auxiliars

6.13.1. Synthese des 2ME-Vorläufermoleküls 139

Weinrebamid **138**

Die Synthese erfolgte ausgehend von *N, O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (0.50 g, 5.13 mmol) nach bekannter Arbeitsvorschrift.^[51]

Ausbeute: 3.62 mmol (71%); C₂₃H₂₃NO₂S (MW = 377.50 g·mol⁻¹).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.50-7.46 (m, 6H), 7.35-7.21 (m, 9H), 3.48 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 3.10 (s, 2H).

2-(S-Trt)-Thioethanal **139**

Das Weinrebamid **138** (250 mg, 662 μmol) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst, die Lösung auf -78 °C gekühlt und anschließend LiAlH₄ (207 μL, 725 μmol, 3.5 M in THF/Toluol) zugetropft. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von wässriger NaHSO₄-Lösung (25 mL, 5 Gew.-%) beendet und die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde das Gemisch mit DCM (50 mL) versetzt, die organische Phase abgetrennt, mit wässriger NaHSO₄-Lösung (2 x 50 mL, 5 Gew.-%) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/EDMA = 2/1/0.01, v/v/v) und dabei das gewünschte Produkt (183 mg, 575 μmol, 87%) als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.77-8.76 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.38-7.35 (m, 3H), 7.24-7.16 (m, 12H), 3.02-3.01 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 196.7, 144.2, 129.7, 128.3, 127.3, 67.6, 42.6.

6.13.2. Synthese der 2ME-Auxiliarpeptide

Die Synthese der 2ME-Auxiliarpeptide **143Z** erfolgte wie in Kapitel 6.5 beschrieben: Die Peptide wurden auf einem Rink-Amid-Harz nach der Fmoc-SPPS aufgebaut und das 2ME-Auxiliar durch reduktive Aminierung eingeführt. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten und in Diethylether gefällt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels präparativer HPLC gereinigt.

143G: UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 968.6$ ((M+H)⁺, ber.: 968.5), 484.9 ((M+2H)²⁺, ber.: 484.7); Summenformel: C₄₀H₆₅N₁₃O₁₃S (MW = 968.1 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 17.9 µmol; Ausbeute: 3.18 µmol (18%; A₂₈₀ = 0.408, V = 1.0 mL).

143F: UPLC-MS: $t_R = 2.7$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1058.6$ ((M+H)⁺, ber.: 1058.5), 529.8 ((M+2H)²⁺, ber.: 529.8); Summenformel: C₄₇H₇₁N₁₃O₁₃S (MW = 1058.2 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 8.0 µmol; Ausbeute: 1.34 µmol (17%; A₂₈₀ = 0.171, V = 1.0 mL). *Anmerkung: Die geringe Ausbeute ist auf den unvollständigen Umsatz des Startmaterials zurückzuführen (Abbildung 94C).*

143N: UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1025.6$ ((M+H)⁺, ber.: 1025.5), 513.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 513.2); Summenformel: C₄₂H₆₈N₁₄O₁₄S (MW = 1025.2 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 12.8 µmol; Ausbeute: 4.91 µmol (38%; A₂₈₀ = 0.628, V = 1.0 mL). *Anmerkung: Die geringe Ausbeute ist auf den unvollständigen Umsatz des Startmaterials zurückzuführen (Abbildung 94C').*

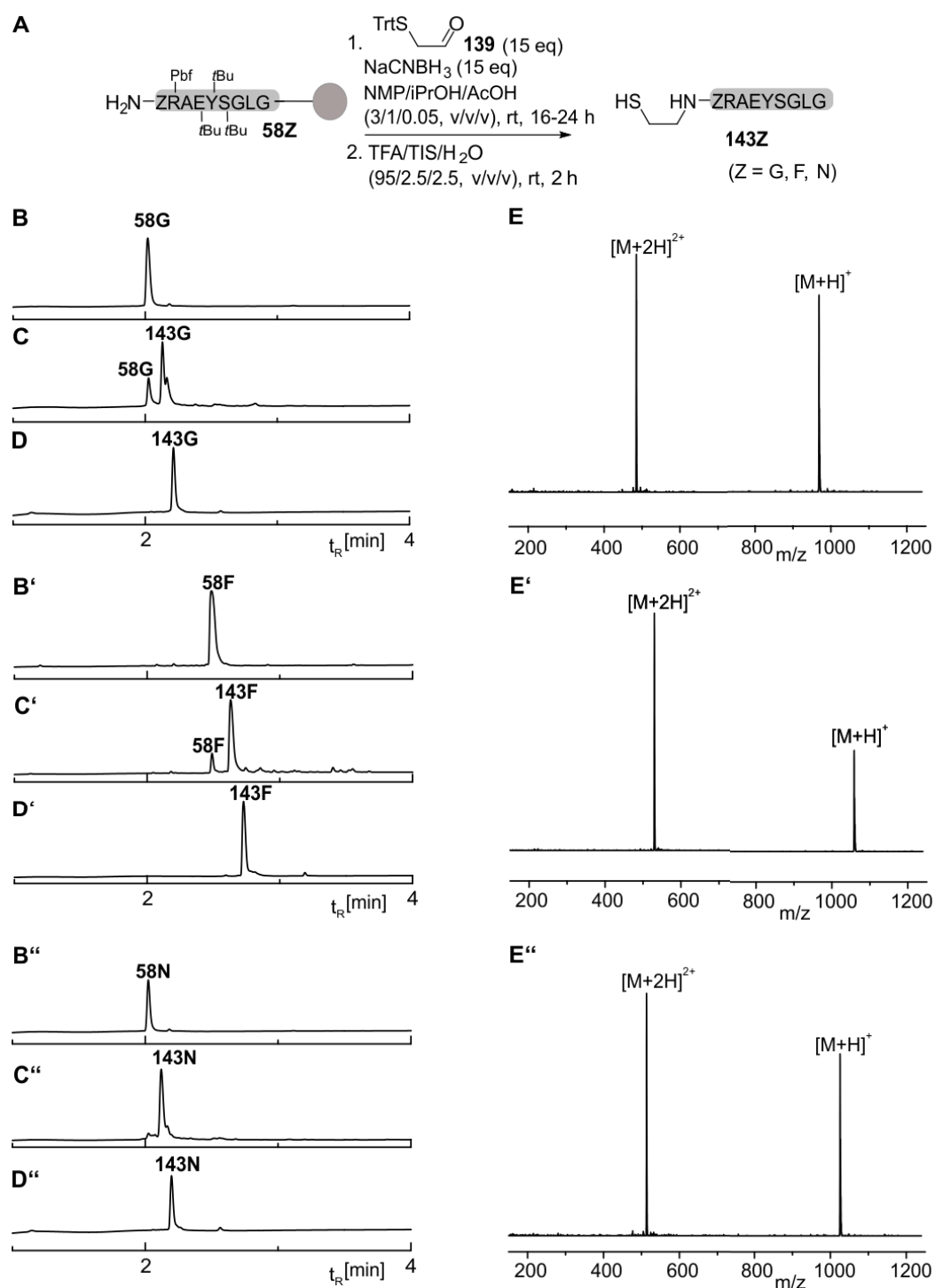


Abbildung 95: Synthese der 2ME-Auxiliarpeptide **143Z** (A): UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der reduktiven Aminierung. UPLC-(D-D'') und ESI-MS-Analysen (E-E'') der gereinigten Peptide.

6.13.3. Vergleich des 2MPE- und 2ME-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Die Peptidligationen wurden wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktionen wurden die Auxiliarpeptide mit den Peptidthioestern **22X** (1 - 2 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2 – 5 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt.

Leu-Gly-Ligation: Peptidthioester **22L** (200 nmol) und Auxiliarpeptid **143G** (200 nmol) wurden in 40 µL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht (Peptidkonzentration = 5 mM).

145LG: UPLC-MS: t_R = 2.9 min (3-40% B in 4 min); m/z = 793.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 792.9), 529.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 528.9); Summenformel: C₇₀H₁₁₃N₂₁O₁₉S (MW = 1584.9 g·mol⁻¹).

Ala-Asn- und Leu-Asn-Ligation: Peptidthioester **22A/22L** (200 nmol) und Auxiliarpeptid **84N/143N** (100 nmol) wurden in 50 µL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht (c(**84N/143N**) = 2 mM).

86AN: UPLC-MS: t_R = 3.8 min (3-30% B in 6 min); m/z = 839.1 ((M+2H)²⁺, ber.: 838.4), 559.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 559.2.6); Summenformel: C₇₅H₁₁₄N₂₂O₂₀S (MW = 1675.9 g·mol⁻¹).

145AN: UPLC-MS: t_R = 3.8 min (3-30% B in 8 min); m/z = 800.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 800.4), 534.1 ((M+3H)³⁺, ber.: 533.9); Summenformel: C₆₉H₁₁₀N₂₂O₂₀S (MW = 1599.8 g·mol⁻¹).

86LN: UPLC-MS: t_R = 3.8 min (3-30% B in 6 min); m/z = 860.2 ((M+2H)²⁺, ber.: 859.4), 573.6 ((M+3H)³⁺, ber.: 573.3); Summenformel: C₇₈H₁₂₀N₂₂O₂₀S (MW = 1718.0 g·mol⁻¹).

145LN: UPLC-MS: t_R = 4.4 min (3-30% B in 8 min); m/z = 821.8 ((M+2H)²⁺, ber.: 821.4), 548.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 548.0); Summenformel: C₇₂H₁₁₆N₂₂O₂₀S (MW = 1641.9 g·mol⁻¹).

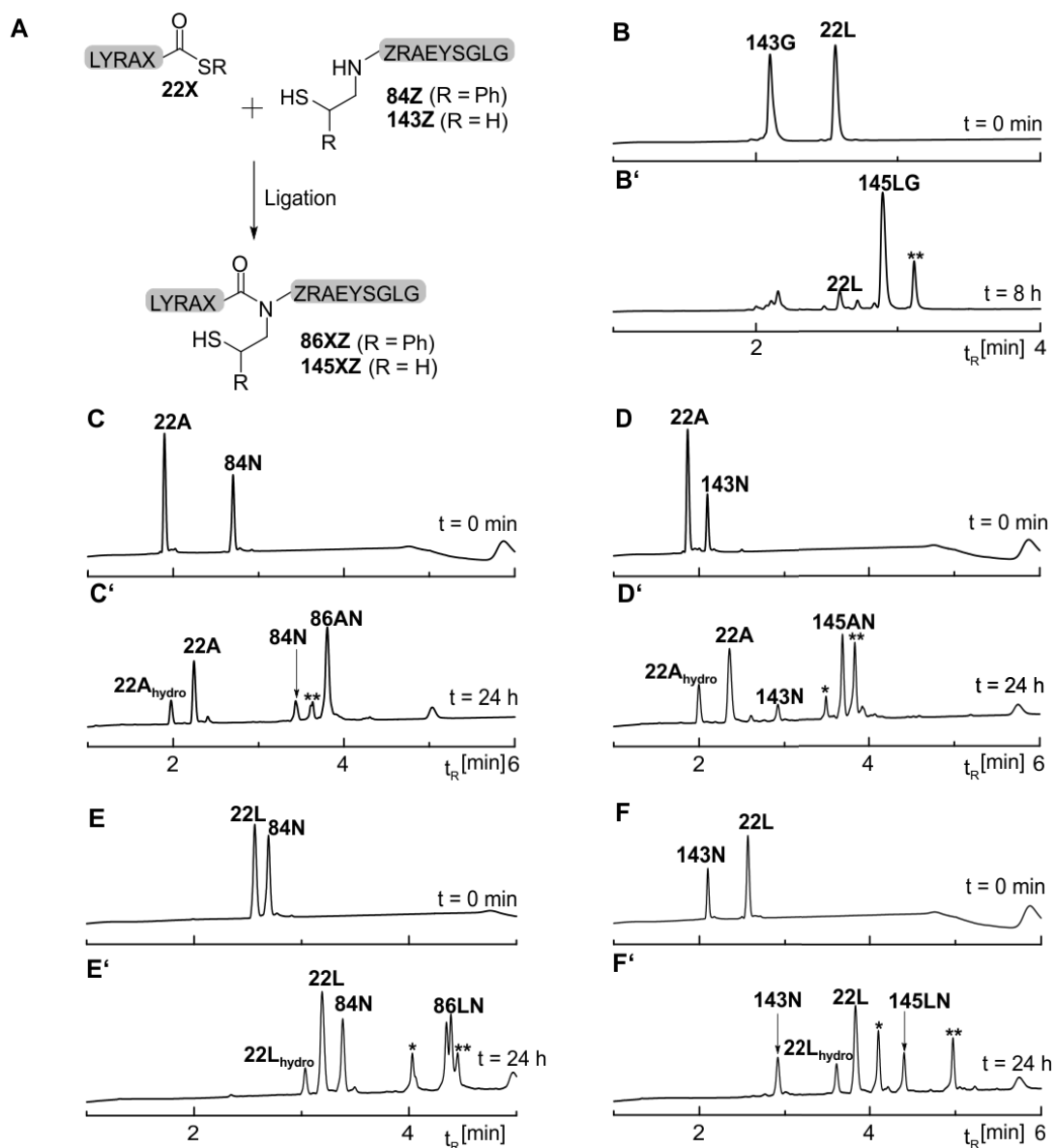


Abbildung 96: Anwendung des 2ME-Auxiliars (R = H) und 2MPE-Auxiliars (R = Ph) in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B-F) und nach (B'-F') der Peptidligation. Bedingungen: c(Peptid) = 2 - 4 mM, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH; pH 7.5, RT; R: (CH₂)₂CONHCH₂CONH₂.*: Thioester-Intermediat der Peptidligation; **: S- und N-acetyliertes Ligationsprodukt der Peptidligation.

6.13.4. Synthese der 2ME-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte

Die Synthese der Ligationsprodukte **145XZ** erfolgte wie in Kapitel 6.5 beschrieben: Für die ENCL-Reaktion wurden die Auxiliarpeptide **143Z** mit dem Peptidthioester **22X** (1.2 - 2 Äq.) in einem wässrigen Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 2-4 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-MS

verfolgt und anschließend die Ligationsprodukte **145XZ** durch semi-präparative HPLC gereinigt.

145GG: Peptidthioester **22G** (1.1 μmol) und Auxiliärpeptid **143G** (1.0 μmol) wurden in 500 μL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht. Nach 90 min wurde das Rohprodukt durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC (3-40% B in 30 min) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung wurde das gewünschte Ligationsprodukt (729 nmol, 73% Ausbeute; $A_{280} = 0.373$, $V = 0.5 \text{ mL}$) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: $t_R = 2.5 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); $m/z = 765.1$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 764.9), 510.7 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 510.3); Summenformel: $\text{C}_{66}\text{H}_{105}\text{N}_{21}\text{O}_{19}\text{S}$ (MW = $1528.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

145QF: Peptidthioester **22Q** (1028 nmol) und Auxiliärpeptid **143F** (857 nmol) wurden in 428 μL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht. Nach 48 h wurde weiterer Peptidthioester **22Q** (857 nmol) und frischer Ligationspuffer (214 μL) zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde das Rohprodukt durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC (3-60% B in 30 min) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung wurde das gewünschte Ligationsprodukt (332 nmol, 41% Ausbeute; 48 nmol wurden zur intermediären Analyse verwendet, $A_{280} = 0.170$, $V = 0.5 \text{ mL}$) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: $t_R = 3.1 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); $m/z = 845.5$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 845.0), 564.0 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 564.0); Summenformel: $\text{C}_{76}\text{H}_{116}\text{N}_{22}\text{O}_{20}\text{S}$ (MW = $1690.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

145AN: Peptidthioester **22A** (2.0 μmol) und Auxiliärpeptid **143N** (2.0 μmol) wurden in 500 μL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht. Nach 48 h wurden 20 μL einer wässrigen 2 M NaOH-Lösung zugegeben. Nach weiteren 60 min wurde das Rohprodukt durch Anwendung einer semi-präparativen HPLC (3-60% B in 30 min) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung wurde das gewünschte Ligationsprodukt (887 nmol, 44% Ausbeute; $A_{280} = 0.454$, $V = 0.5 \text{ mL}$) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: $t_R = 3.8 \text{ min}$ (3-30% B in 8 min); $m/z = 800.6$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 800.4), 534.1 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 533.9); Summenformel: $\text{C}_{69}\text{H}_{110}\text{N}_{22}\text{O}_{20}\text{S}$ (MW = $1599.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

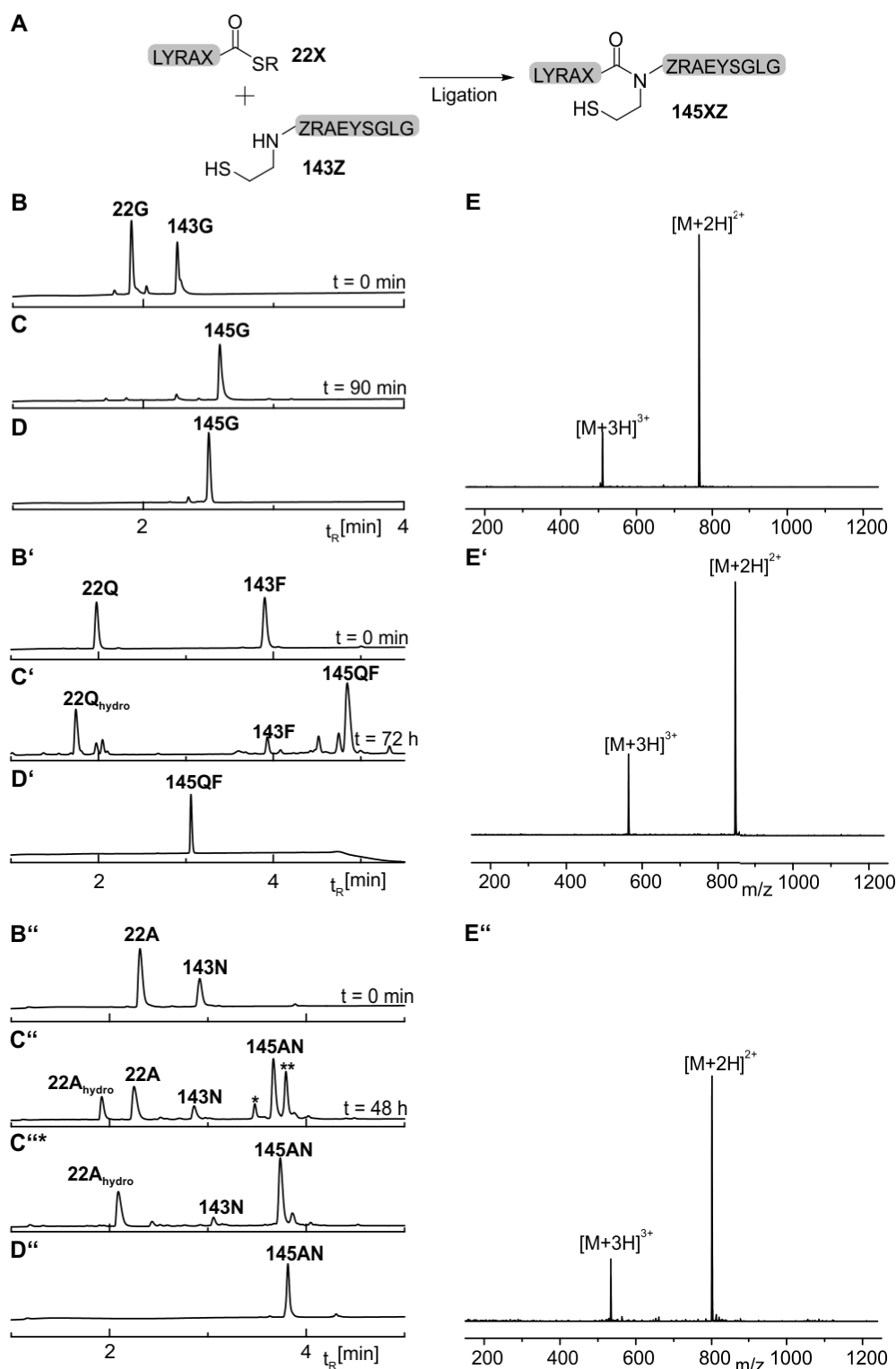


Abbildung 97: Anwendung 2ME-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B-B''), nach (C-C'') der Peptidligation und nach basischer Hydrolyse (C''). UPLC-(D-D'') und ESI-MS-Analysen (E/E') der gereinigten Peptide. Bedingungen: c(Peptide) = 2-4 mM, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH; pH 7.5, RT; R: (CH₂)₂CONHCH₂CONH₂.

6.13.5. Abspaltung des 2ME-Auxiliars

Die Durchführung der Auxiliar-Abspaltung erfolgte wie in Kapitel 6.6 beschrieben: Die 2ME-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte **145GG**, **145QF** und **145AN** wurden mit einer wässrigen Lösung von TCEP und Morpholin behandelt (Peptidkonzentration = 0.5 mM). Die Bedingungen sind in den Abbildungen aus Kapitel 4.3 zu entnehmen.

Analytische Daten:

Abspaltung am Gly-Gly-verknüpften Ligationsprodukt **145GG**:

Ohne TEMPO: **30GG**: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 735.1$ ((M+2H)²⁺, ber.: 734.9), 490.5 ((M+3H)³⁺, ber.: 490.3); Summenformel: C₆₄H₁₀₁N₂₁O₁₉ (MW = 1468.6 g·mol⁻¹)

Mit TEMPO: **145GG**: UPLC-MS: $t_R = 2.7$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 765.0$ ((M+2H)²⁺, ber.: 764.9), 510.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 510.3); Summenformel: C₆₆H₁₀₅N₂₁O₁₉S (MW = 1528.8 g·mol⁻¹).

Abspaltung am Gln-Phe-verknüpften Ligationsprodukt **145QF**:

30QF: UPLC-MS: $t_R = 2.8$ min (3-40 in 4 min); 815.8 ((M+2H)²⁺, ber.: 815.9), 544.1 ((M+3H)³⁺, ber.: 544.3); Summenformel: C₇₄H₁₁₁N₂₁O₂₁.

30QF*: UPLC-MS: $t_R = 3.0$ min (3-40 in 4 min); 829.4 ((M+2H)²⁺, ber.: 829.9), 553.2((M+3H)³⁺, ber.: 553.6); Summenformel: C₇₅H₁₁₁N₂₁O₂₂.

150F: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40 in 4 min); 1026.5 ((M+H)⁺, ber.: 1026.5), 513.7 ((M+2H)²⁺, ber.: 513.8); Summenformel: C₄₆H₆₇N₁₃O₁₄.

Abspaltung am Ala-Asn-verknüpften Ligationsprodukt **145AN**:

30AN: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 770.4$ ((M+2H)²⁺, ber.: 770.9), 514.3 ((M+3H)³⁺, ber.: 514.3); Summenformel: C₆₇H₁₀₅N₂₁O₂₁ (MW = 1540.7 g·mol⁻¹)

30AN*: UPLC-MS: $t_R = 2.9$ min 3-40 in 4 min; 784.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 784.9), 523.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 523.6); Summenformel: C₆₈H₁₀₅N₂₁O₂₂.

150N: UPLC-MS: $t_R = 2.1$ min (3-40 in 4 min); 993.6 ((M+H)⁺, ber.: 993.5), 497.3 ((M+2H)²⁺, ber.: 497.2); Summenformel: C₄₁H₆₄N₁₄O₁₅.

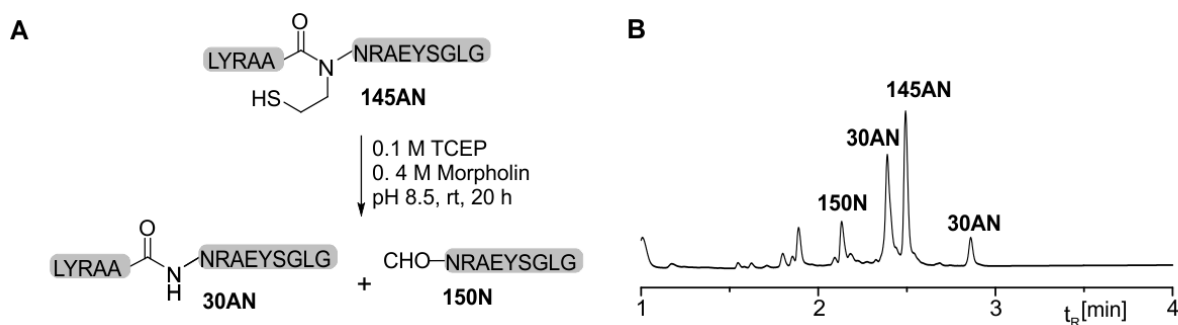


Abbildung 98: Abspaltung des 2ME-Auxiliars vom gereinigten Ligrationsprodukt **145AN** (A): UPLC-Analyse nach der Auxiliar-Abspaltung (B). Bedingungen: Siehe Abbildung; Peptidkonzentration = 0.5 mM.

6.14. Synthese und Anwendung des 2MP-Auxiliars

6.14.1. Synthese des 2MP-Vorläufermoleküls

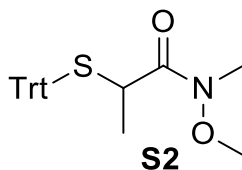
Weinrebamid **141**

Bei Raumtemperatur wurde 2-Bromopropionsäure **140** (1.80 mL, 3.06 g, 20.0 mmol) und Kalium-O-Ethylthiocarbonat (3.82 g, 23.9 mmol) in Aceton (20 mL) zur Reaktion gebracht. Nach 16 h wurde das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der verbleibende Rückstand wurde in trockenem DCM (20 mL) aufgenommen, die Lösung auf 0°C gekühlt und dazu *N*, *O*-Dimethylhydroxylamin-Hydrochlorid (2.15 g, 22.0 mmol), Triethylamin (2.77 mL, 2.02 g, 20.0 mmol) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (5.73 g, 30.0 mmol) gegeben. Nach Zugabe wurde das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch 16 h gerührt. Anschließend wurde mit wässriger 1 M HCl (1 x 20 mL) und Wasser (1 x 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 3/1, v/v) und dabei das gewünschte Produkt (1.86 g, 7.84 mmol, 39% über 2 Stufen) als gelbliches Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 4.93-4.92 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.66-4.61 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.22 (s, 3H), 1.56-1.55 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.42-1.40 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 213.7, 171.8, 70.4, 61.8, 46.0, 32.7, 17.4, 13.9.

MS (ESI): m/z = 260.12 ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}_2\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, ber.: 259.99) ; $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}_2$ (MW = 237.34 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Thioether S2

Unter Schutzgas-Atmosphäre wurde zu einer Lösung des Xanthogenats **141** (1.51 g, 6.36 mmol) in trockenem DCM (20 mL) bei 0°C tropfenweise mit Piperidin (691 µL, 595 mg, 6.99 mmol) versetzt. Nach 30 min wurde weiteres Piperidin (251 µL, 216 mg, 2.54 mmol) zugetropft. 15 Min später wurde die Reaktion durch Zugabe von wässriger 1 M HCl (10 mL) abgebrochen, die organische Phase abgetrennt und ein weiteres Mal mit wässriger 1 M HCl (10 mL) gewaschen. Anschließend wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in trockenem DCM (20 mL) aufgenommen und mit Tritylchlorid (2.13 g, 7.64 mmol) sowie Triethylamin (1.06 mL, 774 mg, 7.65 mmol) versetzt. Nach 3.5 h wurden die flüchtige Bestandteile im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/EDMA = 3/1/0.005, v/v/v) und dabei das gewünschte Produkt (1.43 g, 3.65 mmol, 58 % über 2 Stufen) als weißer Feststoff erhalten wurde.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.46-7.43 (m, 6H), 7.29-7.25 (m, 6H), 7.22-7.18 (m, 3H), 3.39 (s, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 1.12-1.11 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 144.9, 129.9, 127.9, 126.8, 68.3, 61.3, 40.7, 19.9.

MS (ESI): *m/z* = 414.41 (C₂₄H₂₅NO₂SNa (M+Na)⁺, ber.: 414.15)); C₂₄H₂₅NO₂S (MW = 391.53 g·mol⁻¹).

S-Trt-2-Mercapto-propanal (142)

Das Weinrebamid **S2** (250 mg, 639 µmol) wurde in trockenem THF (4 mL) gelöst, die Lösung auf -78°C gekühlt und anschließend tropfenweise LiAlH₄ (219 µL, 767 µmol, 3.5 M in THF/Toluol) zugegeben. Nach 120 min wurde die Reaktion durch Zugabe einer wässrigen NaHSO₄-Lösung (25 mL, 5 Gew.-%) beendet und die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde das Gemisch mit DCM (50 mL) versetzt, die organische Phase

abgetrennt, mit wässriger NaHSO₄-Lösung (2 x 50 mL, 5 Gew.-%) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat/EDMA = 4/1/0.05, v/v/v) und dabei das gewünschte Produkt (205 mg, 617 µmol, 96 %) als braunes Öl erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.63 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.42-7.40 (m, 6H), 7.24-7.20 (m, 6H), 7.17-7.13 (m, 3H), 2.98-2.93 (m, *J*₁ = 2.4 Hz, *J*₂ = 7.4 Hz, 1H), 1.16-1.15 (d, *J* = 7.4 Hz, 6H).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 197.4, 144.5, 129.6, 128.3, 127.2, 68.4, 48.5, 14.5.

MS (ESI): *m/z* = 305.30 (C₂₁H₂₁S (M+H)⁺, ber.: 305.14; α-Decarboxylierung); C₂₂H₂₀OS (MW = 332.46 g·mol⁻¹).

6.14.2. Synthese der 2MP-Auxiliarpeptide

Die Synthese der 2ME-Auxiliarpeptide **144Z** erfolgte wie in Kapitel 6.5 beschrieben: Die Peptide wurden auf einem Rink-Amid-Harz nach der Fmoc-SPPS aufgebaut und das 2MP-Auxiliar durch reduktive Aminierung eingeführt. Anschließend wurden die Peptide vom polymeren Träger abgespalten und in Diethylether gefällt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels präparativer HPLC gereinigt.

144G: UPLC-MS: *t_R* = 2.4 min (3-40% B in 4 min); *m/z* = 982.7 ((M+H)⁺, ber.: 982.5), 491.9 ((M+2H)²⁺, ber.: 491.7); Summenformel: C₄₁H₆₇N₁₃O₁₃S (MW = 982.1 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 15.0 µmol; Ausbeute: 4.49 µmol (30%; A₂₈₀ = 0.575, V = 1.0 mL).

144N: UPLC-MS: *t_R* = 2.4 min (3-40% B in 4 min); *m/z* = 1039.7 ((M+H)⁺, ber.: 1039.5), 520.5 ((M+2H)²⁺, ber.: 520.3); Summenformel: C₄₃H₇₀N₁₄O₁₄S (MW = 1039.2 g·mol⁻¹); präparative HPLC-Reinigung: 3-45% B in 30 min; Synthesemaßstab: 15.0 µmol; Ausbeute: 5.85 µmol (39%; A₂₈₀ = 0.749, V = 1.0 mL).

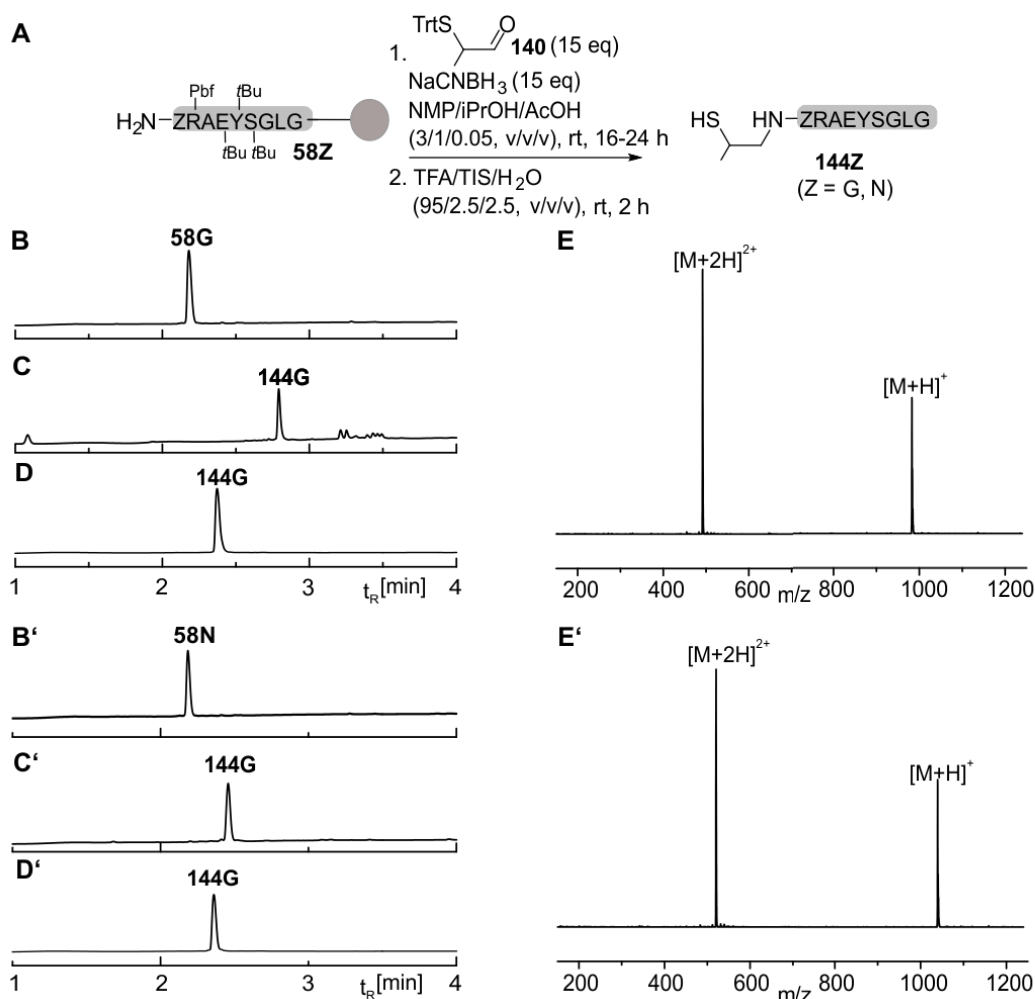


Abbildung 99: Synthese der 2MP-Auxiliarpeptide **144Z** (A): UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der reduktiven Aminierung. UPLC-(D-D'') und ESI-MS-Analysen (E-E'') der gereinigten Peptide.

6.14.3. Einsatz des 2MP-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Die Peptidligationen wurden wie in Kapitel 6.5 beschrieben durchgeführt: Für die ENCL-Reaktionen wurden die Auxiliarpeptide **144Z** mit den Peptidthioestern **22X** (1 – 1.1 Äq.) in einem wässrigen Ligationpuffer (20 mM TCEP, 100 mM NaH₂PO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) umgesetzt (Peptidkonzentration = 5 mM.) Der Reaktionsfortschritt wurde mittels UPLC-Analyse verfolgt.

Analytischer Maßstab:

Ala-Asn-Ligation: Peptidthioester **22A** (275 nmol) und Auxiliarpeptid **144N** (250 nmol) wurden in 50 μ L Ligationpuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht.

UPLC-MS: $t_R = 2.6\text{--}2.8$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 807.8$ ((M+2H)²⁺, ber.: 807.4), 538.9 ((M+3H)³⁺, ber.: 538.6); Summenformel: C₇₀H₁₁₂N₂₂O₂₀S (MW = 1613.9 g·mol⁻¹).

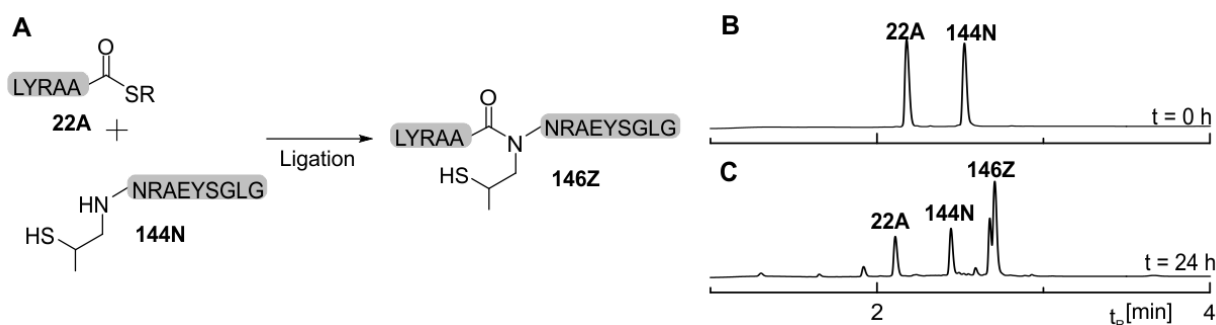


Abbildung 100: Anwendung des 2MP-Auxiliars in der Ala-Asn-Peptidligation (A): UPLC-Analysen vor (B) und nach (C) der Peptidligation. Bedingungen: c (144N) = 5 mM, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH; pH 7.5, RT; R: (CH₂)₂CONHCH₂CONH₂.

Präparativer Maßstab:

146GG: Peptidthioester **22G** (1.0 µmol) und Auxiliärpeptid **144G** (1.0 µmol) wurden in 200 µL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht. Nach vier Stunden wurde das Rohprodukt mittels semi-präparativer HPLC (3-40% B in 30 min) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung wurde das gewünschte Ligationsprodukt (632 nmol, 63% Ausbeute; A₂₈₀ = 0.323, V = 0.5 mL) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: $t_R = 2.6$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 772.3$ ((M+2H)²⁺, ber.: 771.9), 515.2 ((M+3H)³⁺, ber.: 514.9); Summenformel: C₆₇H₁₀₇N₂₁O₁₉S (MW = 1542.8 g·mol⁻¹).

146AN: Peptidthioester **22A** (1.0 µmol) und Auxiliärpeptid **144N** (1.0 µmol) wurden in 200 µL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 100 mM Na₂HPO₄, 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) bei RT zur Reaktion gebracht. Nach 22 h wurde zusätzlicher Peptidthioester (0.5 µmol, gelöst in 100 µL Ligationspuffer) zugegeben. Nach weiteren 3 d wurde das Rohprodukt mittels semi-präparativer HPLC (3-40% B in 30 min) gereinigt. Nach der Gefriertrocknung wurde das gewünschte Ligationsprodukt (612 nmol, 61% Ausbeute; A₂₈₀ = 0.313, V = 0.5 mL) als weißer Feststoff erhalten.

UPLC-MS: $t_R = 2.5\text{--}2.7$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 807.7$ ((M+2H)²⁺, ber.: 807.4), 538.8 ((M+3H)³⁺, ber.: 538.6); Summenformel: C₇₀H₁₁₂N₂₂O₂₀S (MW = 1613.9 g·mol⁻¹).

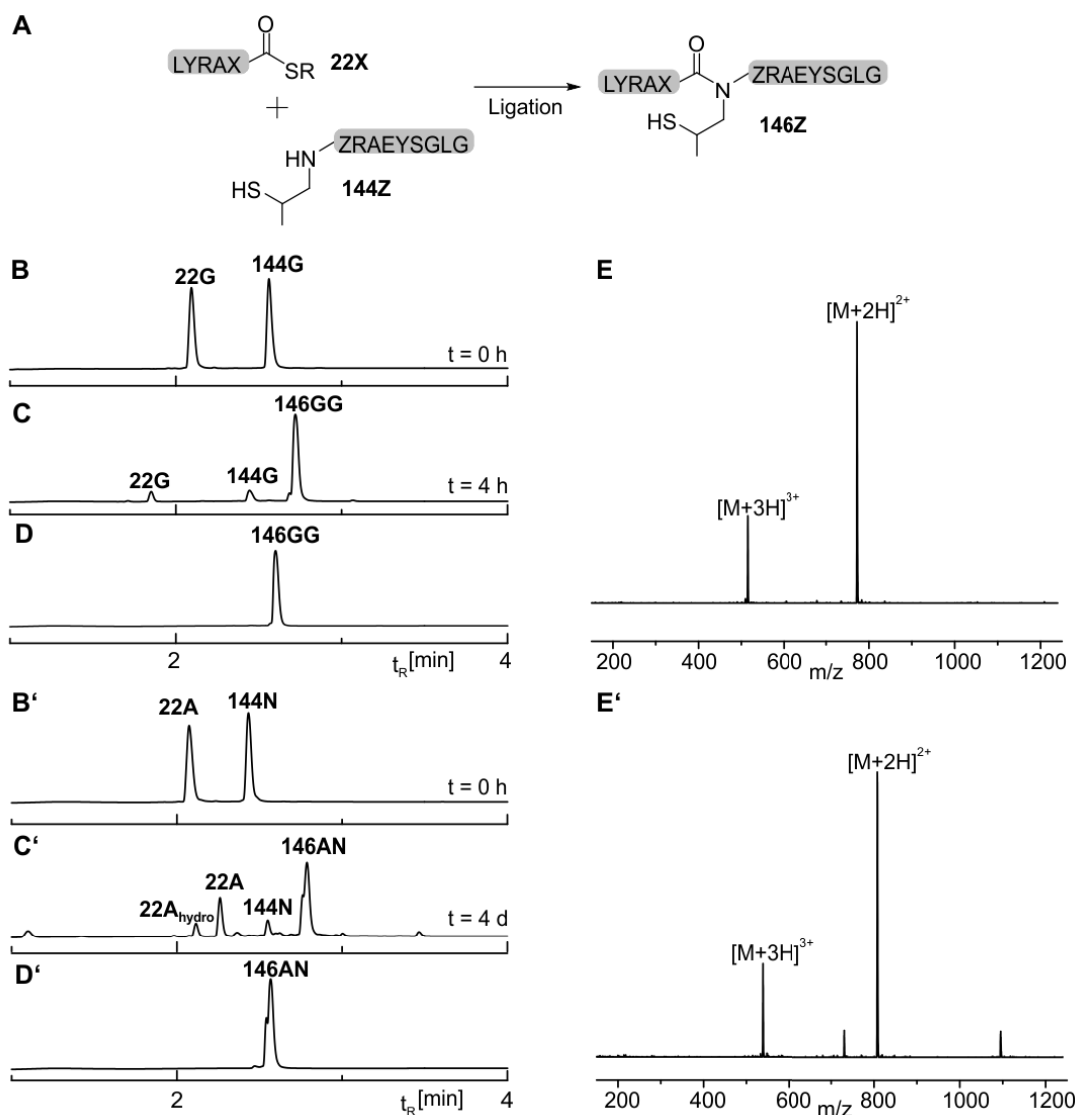


Abbildung 101: Anwendung 2MP-Auxiliars in ENCL-Reaktionen (A): UPLC-Analysen vor (B-B') und nach (C-C') der Peptidligation. UPLC-(D-D') und ESI-MS-Analysen (E/E') der gereinigten Peptide. Bedingungen: $c(\text{Peptid}) = 5 \text{ mM}$, $100 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 3 Vol.-% PhSH; pH 7.5, RT; R: $(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CONH}_2$.

6.14.4. Abspaltung des 2MP-Auxiliars

Die Durchführung der Auxiliar-Abspaltung erfolgte wie in Kapitel 6.6 beschrieben: Die 2ME-Auxiliar-tragenden Ligationsprodukte **151GG** und **151AN** wurden mit einer wässrigen Lösung von TCEP und Morpholin behandelt (Peptidkonzentration = 0.5 mM). Die Bedingungen sind den Abbildungen aus Kapitel 4.3 zu entnehmen.

Analytische Daten:

Abspaltung am Gly-Gly-verknüpften Ligationsprodukt **151GG**:

30GG: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 735.1$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 734.9), 490.5 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 490.3); Summenformel: $C_{64}H_{101}N_{21}O_{19}$ (MW = 1468.6 g·mol⁻¹)

Abspaltung am Ala-Asn-verknüpften Ligationsprodukt **151AN**:

30AN: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 770.7$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 770.9), 514.3 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 514.3); Summenformel: $C_{67}H_{105}N_{21}O_{21}$ (MW = 1540.7 g·mol⁻¹)

30AN*: UPLC-MS: $t_R = 2.9$ min 3-40% B in 4 min; 784.6 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 784.9), 523.6 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 523.6); Summenformel: $C_{68}H_{105}N_{21}O_{22}$.

150N: UPLC-MS: $t_R = 2.3$ min (3-40% B in 4 min); 993.6 ($(M+H)^+$, ber.: 993.5), 497.3 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 497.2); Summenformel: $C_{41}H_{64}N_{14}O_{15}$.

Ac-NRAEYSGLG: UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40%B in 4 min); 1007.7 ($(M+H)^+$, ber.: 1007.5), 504.2 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 504.2); Summenformel: $C_{42}H_{66}N_{14}O_{15}$.

6.15. HPLC-freie Proteinsynthese

6.15.1 Synthese der His₆-MUC1-Peptidthioester **161a-c**

Die Peptidthioester **161a-c** wurden an einem vorbeladenen Fmoc-His(Trt)-Chlorotritylharz (siehe Abschnitt 6.4.1.) aufgebaut (Synthesemaßstab: 25.0 µmol). Nach der Fmoc-SPPS, wurden die vollständig geschützte Peptidsäuren in den entsprechenden Peptidthioester überführt. Der Fortschritt der Reaktion wurde durch UPLC-Analyse verfolgt. Nach der TFA-Behandlung und Ether-Fällung wurden die erhaltenen Rohprodukte der Peptidthioester in wässriger 0.1% TFA gelöst und anschließend gefriergetrocknet. Dabei wurden die Rohprodukte der Peptidthioester in Form von weißen Feststoffen erhalten.

Rohprodukt des 26 Aminosäuren langen Peptidthioester **161a**: 96.7 mg, 25.2 µmol (Annahme: **161a** als 9-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.3$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 938.2$ ((M+3H)³⁺, ber.: 938.1 (100%)), 704.1 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 703.8 (100%)), 563.5 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 563.3 (100%)); Summenformel: C₁₂₀H₁₇₅N₄₃O₃₅S (MW = 2812.0 g·mol⁻¹).

Rohprodukt des 46 Aminosäuren langen Peptidthioester **161b**: 135 mg, 22.8 µmol (Annahme: **161b** als 11-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1171.1$ ((M+4H)⁴⁺, ber.: 1171.3 (100%)), 937.1 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 937.3 (100%)), 781.4 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 781.2 (100%)), 669.8 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 669.8 (100%)), 586.0 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 586.2 (100%)); Summenformel: C₂₀₀H₃₀₀N₆₈O₆₂S (MW = 4681.0 g·mol⁻¹).

Rohprodukt des 66 Aminosäuren lange Peptidthioester **161c**: 143 mg, 17.8 µmol (Annahme: **161c** als 13-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1092.5$ ((M+6H)⁶⁺, ber.: 1092.7 (100%)), 936.7 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 936.7 (100%)), 819.9 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 819.8 (100%)), 729.1 ((M+9H)⁹⁺, ber.: 728.8 (100%)); Summenformel: C₂₈₀H₄₂₅N₉₃O₈₉S (MW = 6550.01 g·mol⁻¹).

6.15.2. Untersuchung der Racemisierung von C-terminalen His-Resten im Zuge der Thioestersynthese

Die Peptidthioester **S3-D** und **S3-L** wurden an einem vorbeladenen Fmoc-L-His(Trt)- und Fmoc-D-His(Trt)-Chlorotritylharz (siehe Abschnitt 6.4.1) aufgebaut (Synthesemaßstab: 15.0 µmol). Nach der Fmoc-SPPS wurden die vollständig geschützte Peptidsäuren in die entsprechenden Peptidthioester überführt. Der Fortschritt der Reaktion wurde durch UPLC-Analyse verfolgt. Nach der TFA-Behandlung und Ether-Fällung wurden die erhaltenen Rohprodukte der Peptidthioester in wässriger 0.1% TFA gelöst und anschließend gefriergetrocknet. Dabei wurden die Rohprodukte der Peptidthioester in Form von weißen Feststoffen erhalten. Die UPLC-Analyse der erhaltenen Rohprodukte bestätigte, dass die Überführung der Peptid-säuren in die Peptidthioester unter den verwendeten Bedingungen ohne Racemisierung des C-terminalen His-Restes erfolgte.

S3-L: UPLC-MS: $t_R = 6.4$ min (3-8% B in 10 min, CSH-Säule); $m/z = 695.5$ ($(M+H)^+$, ber.: 695.3), 348.5 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 348.2); Summenformel: $C_{30}H_{46}N_8O_9S$ (MW = 694.8 g·mol⁻¹).

S3-D: UPLC-MS: $t_R = 6.1$ min (3-8% B in 10 min, CSH-Säule); $m/z = 695.5$ ($(M+H)^+$, ber.: 695.3), 348.5 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 348.2); $C_{30}H_{46}N_8O_9S$ (MW = 694.8 g·mol⁻¹).

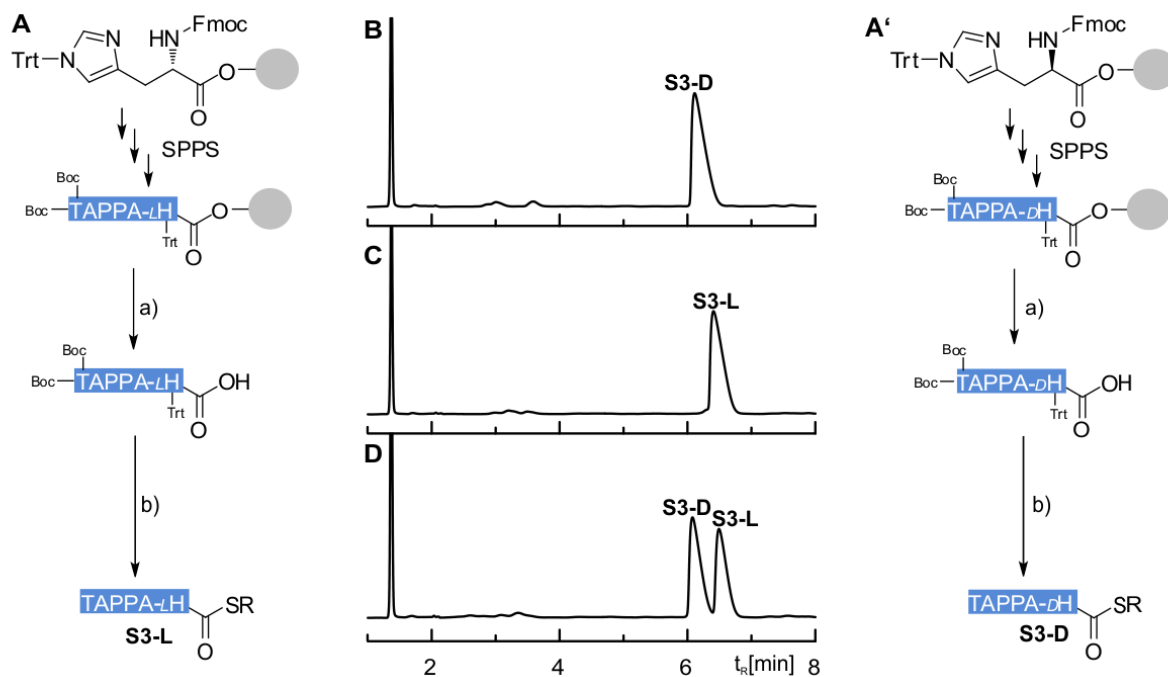


Abbildung 103: Synthese der C-terminalen His-Peptidthioester **S3-L** und **S3-D** (A/A'): UPLC-Analysen der erhaltenen Rohprodukte (B/C) und Koinjektion der beiden Rohprodukte (D). Bedingungen: a) AcOH, CF₃CH₂OH, CHCl₃, RT; b) HS(CH₂)₂CONHCH₂CONH₂, PhSH, DIPEA, PyBOP, -30°C, e) TFA/TIS, RT; R: (CH₂)₂CONHCH₂CONH₂.

6.15.3. Affinitätschromatographie-basierte Reinigung der Peptidthioester

50 μL eines Ni-NTA-Agaroseharzes (50%ige Suspension, *Cube Biotech, Germany*) wurden in einen Spritzenreaktor überführt. Die Lösung wurde abgetrennt und das Harz in einem wässrigen Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5) gequollen (2 min). Anschließend wurde der wässrige Puffer abgetrennt. Die Rohprodukte der His₆-MUC1-Peptidthioester **161a-c** (ca. 200 nmol) wurden in 100 μL eines wässrigen Puffers (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5) gelöst und auf das Harz gegeben. Nach der Immobilisierung (ca. 15 min) wurde der Puffer entfernt und das Harz gewaschen (5 x 200 μL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5), 5 x 200 μL Wasser). Durch Behandlung (10 min) des Harzes mit 200 μL 0.1% TFA wurden die Peptidthioester vom Harz abgetrennt. Die erhaltene Lösung wurde mit Hilfe der UPLC-Analyse untersucht.

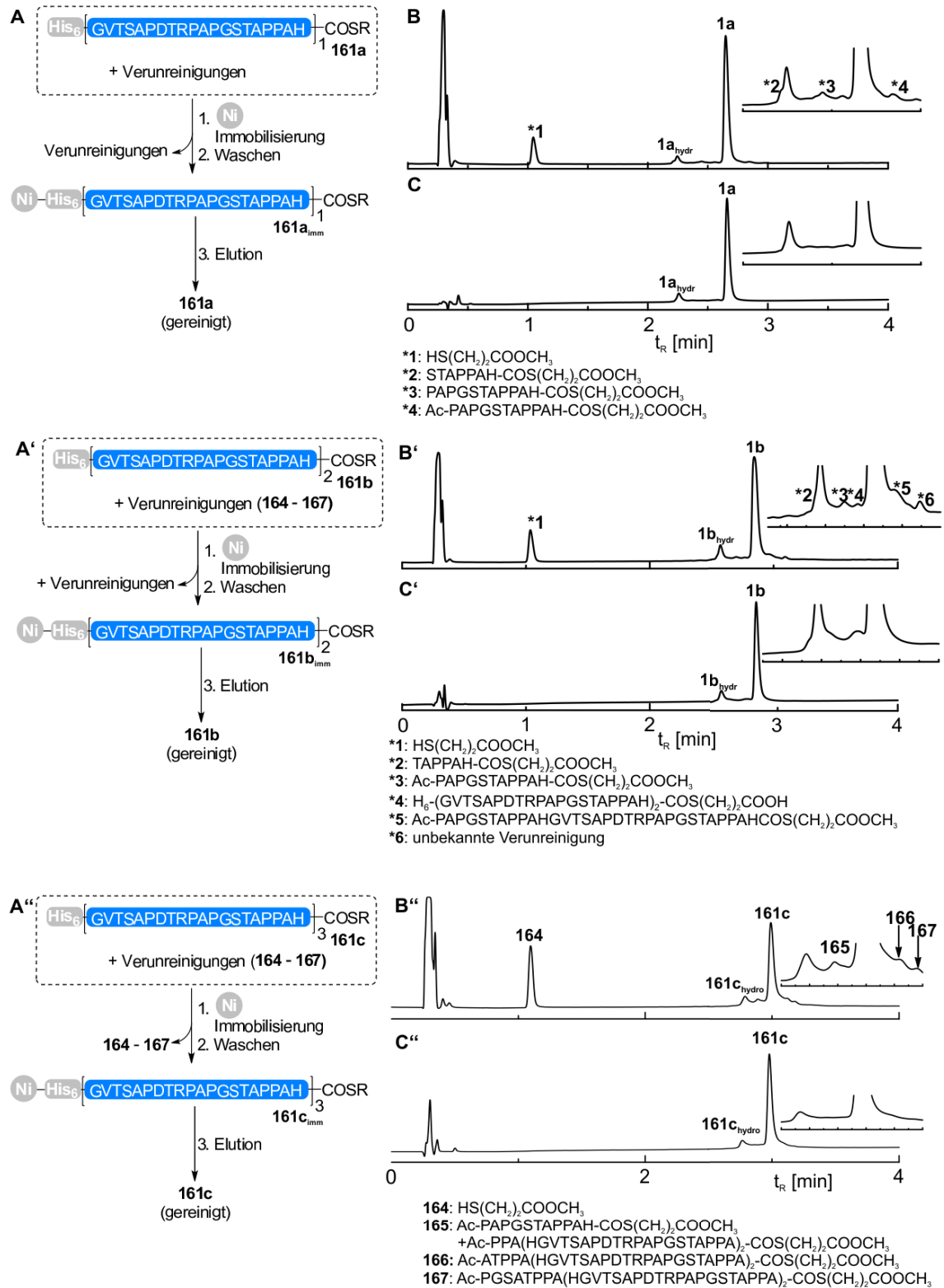


Abbildung 104: Reinigung des His₆-MUC1-Peptidthioesters **161a-c** durch Affinitätschromatographie (A): UPLC-Analysen vor (B-B'') und nach (C-C'') der Affinitätschromatographie-basierten Reinigung. Immobilisierung: **161a-c**, wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5); Waschen: 5 x 200 µL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5); Elution: 0.1% TFA.

6.15.4. Synthese der MUC1-Auxiliarpeptide 162a-c

Die Auxiliarpeptide wurden an einem Fmoc-His(Trt)-Hydrazin-Chlorotriethylharz (Abschnitt 6.4.1) aufgebaut (Synthesemaßstab: 25.0 μmol). Nach der Fmoc-SPPS wurde das 2MPE-Auxiliar durch reduktive Aminierung eingeführt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch UPLC-Analyse verfolgt. Nach TFA-Behandlung, Ether-Fällung und Gefriertrocknung wurden die Rohprodukte der Auxiliarpeptide als weiße Feststoffe erhalten.

20 Aminosäuren langes Auxiliarpeptid **162a**: 44.7 mg, 18.8 μmol (Annahme: **162a** als 3-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1019.4$ ((M+2H) $^{2+}$, ber.: 1019.5 (100%)), 680.1 ((M+3H) $^{3+}$, ber.: 680.0 (100%)), 510.5 ((M+4H) $^{4+}$, ber.: 510.3 (100%)), 408.5 ((M+5H) $^{5+}$, ber.: 408.4 (100%)); Summenformel: $\text{C}_{88}\text{H}_{137}\text{N}_{27}\text{O}_{27}\text{S}$ (MW = 2037.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

40 Aminosäuren langes Auxiliarpeptid **162b**: 68.5 mg, 15.3 μmol (Annahme: **162b** als 5-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.6$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 977.6$ ((M+4H) $^{4+}$, ber.: 977.5 (100%)), 782.3 ((M+5H) $^{5+}$, ber.: 782.2 (100%)), 652.4 ((M+6H) $^{6+}$, ber.: 652.0 (100%)); Summenformel: $\text{C}_{168}\text{H}_{262}\text{N}_{52}\text{O}_{54}\text{S}$ (MW = 3906.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

60 Aminosäuren langes Auxiliarpeptid **162c**: 112 mg, 17.1 μmol (Annahme: **162c** als 7-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.7$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1156.1$ ((M+5H) $^{5+}$, ber.: 1155.8 (100%)), 963.9 ((M+6H) $^{6+}$, ber.: 963.3 (100%)), 826.2 ($\text{C}_{248}\text{H}_{394}\text{N}_{77}\text{O}_{81}\text{S}$ (M+7H) $^{7+}$, ber.: 825.8 (100%)), 723.2 ((M+8H) $^{8+}$, ber.: 722.7 (100%)), 642.8 ((M+9H) $^{9+}$, ber.: 642.5 (100%)); $\text{C}_{248}\text{H}_{387}\text{N}_{77}\text{O}_{81}\text{S}$ (MW = 5775.3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

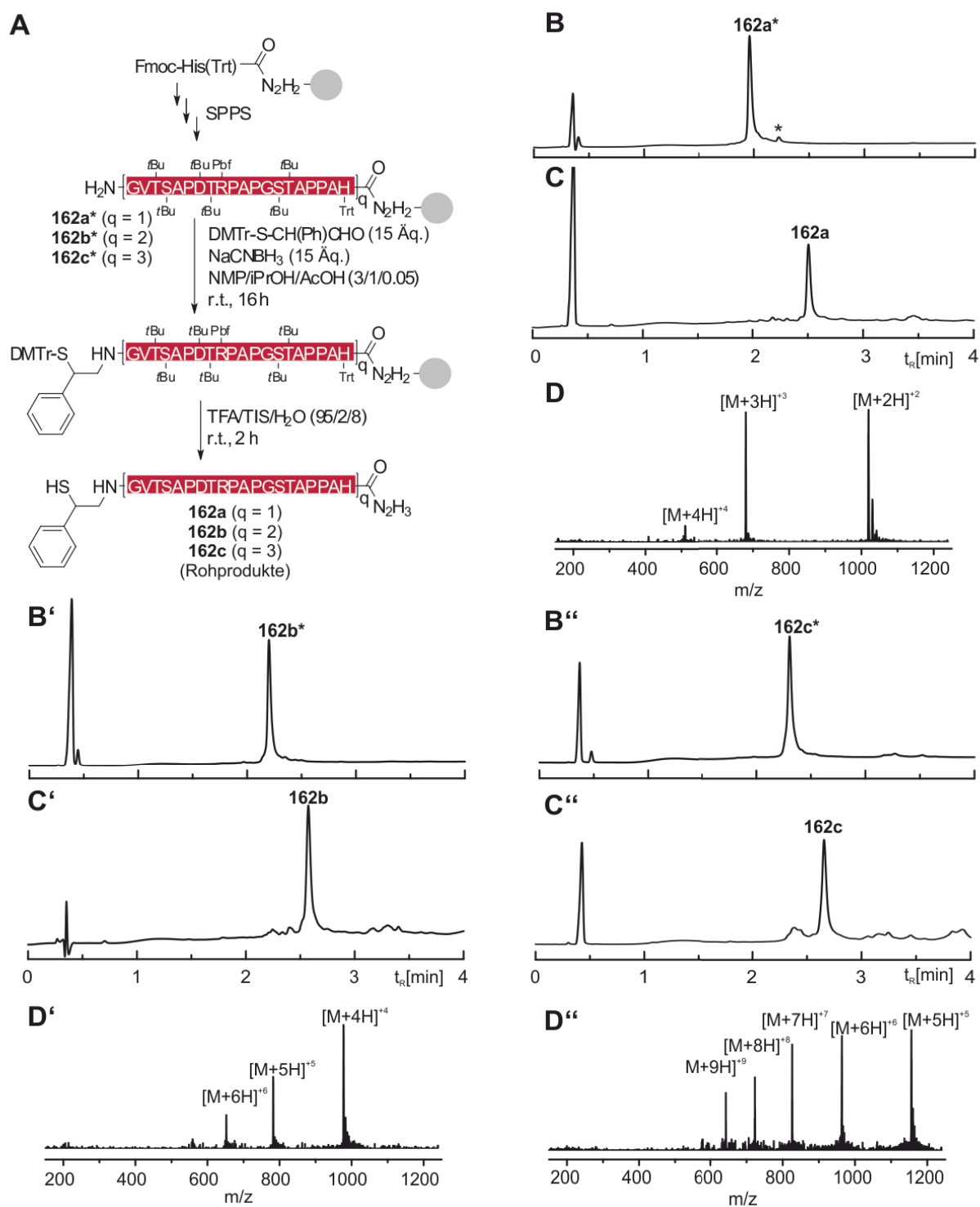


Abbildung 105: Synthese der Auxiliarpeptide **162a-c** (A): UPLC-Analyse vor (B-B'') und nach (C-C'') der reduktiven Aminierung. ESI-MS-Analyse der Auxiliarpeptide **162a-c** (D-D'').

6.15.5. Trifluoracetylierung von C-terminalen Peptidhydraziden durch TFA-Behandlung

Die Synthese des Peptidhydrazids **S4-N₂H₃** und der sequenzanalogen Säure **S4-OH** erfolgte wie in Abschnitt 6.4.1 beschrieben. Nach der Fmoc-SPPS wurden die Peptide durch Behandlung (1 h) mit TFA/TIS (95/5, v/v) und zum Vergleich mit TFA/TIS/Wasser (90/2/8, v/v/v) bei Raumtemperatur vom Harz abgespalten. Das nach der Ether-Fällung erhaltene Material wurde anschließend analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung mit TFA/TIS (95/5, v/v) zur Trifluoracetylierung des Peptidhydrazids **S4-N₂H₃** führte. An der sequenzanalogen Peptidsäure **S4-OH** wurde diese Nebenreaktion nicht beobachtet. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Trifluoracetylierung mit hoher Wahrscheinlichkeit an der C-terminalen Hydrazid-Einheit erfolgt. Durch Zugabe von Wasser (8 Vol.-%) konnte die Nebenreaktion deutlich reduziert werden.

S4-N₂H₃: UPLC-MS: $t_R = 1.9$ min (3-40% B in 6 min); $m/z = 951.8$ ((M+2H)²⁺, ber.: 951.0 (100%)), 634.9 ((M+3H)³⁺, ber.: 634.3 (100%)), 476.4 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 476.0 (100%)); Summenformel: C₈₀H₁₂₉N₂₇O₂₇ (MW = 1901.0 g·mol⁻¹).

S4-TFA: UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-40% B in 6 min); $m/z = 999.6$ ((M+2H)²⁺, ber.: 999.0 (100%)), 666.7 ((M+3H)³⁺, ber.: 666.3 (100%)), 500.3 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 500.0 (100%)); Summenformel: C₈₂H₁₂₈F₃N₂₇O₂₈ (MW = 1997.1 g·mol⁻¹).

S4-OH: UPLC-MS: $t_R = 1.9$ min (3-40% B in 6 min); $m/z = 944.5$ ((M+2H)²⁺, ber.: 944.0 (100%)), 630.0 ((M+3H)³⁺, ber.: 629.7 (100%)), 472.9 ((M+4H)⁴⁺, ber.: 472.5 (100%)); Summenformel: C₈₀H₁₂₇N₂₅O₂₈ (MW = 1887.0 g·mol⁻¹).

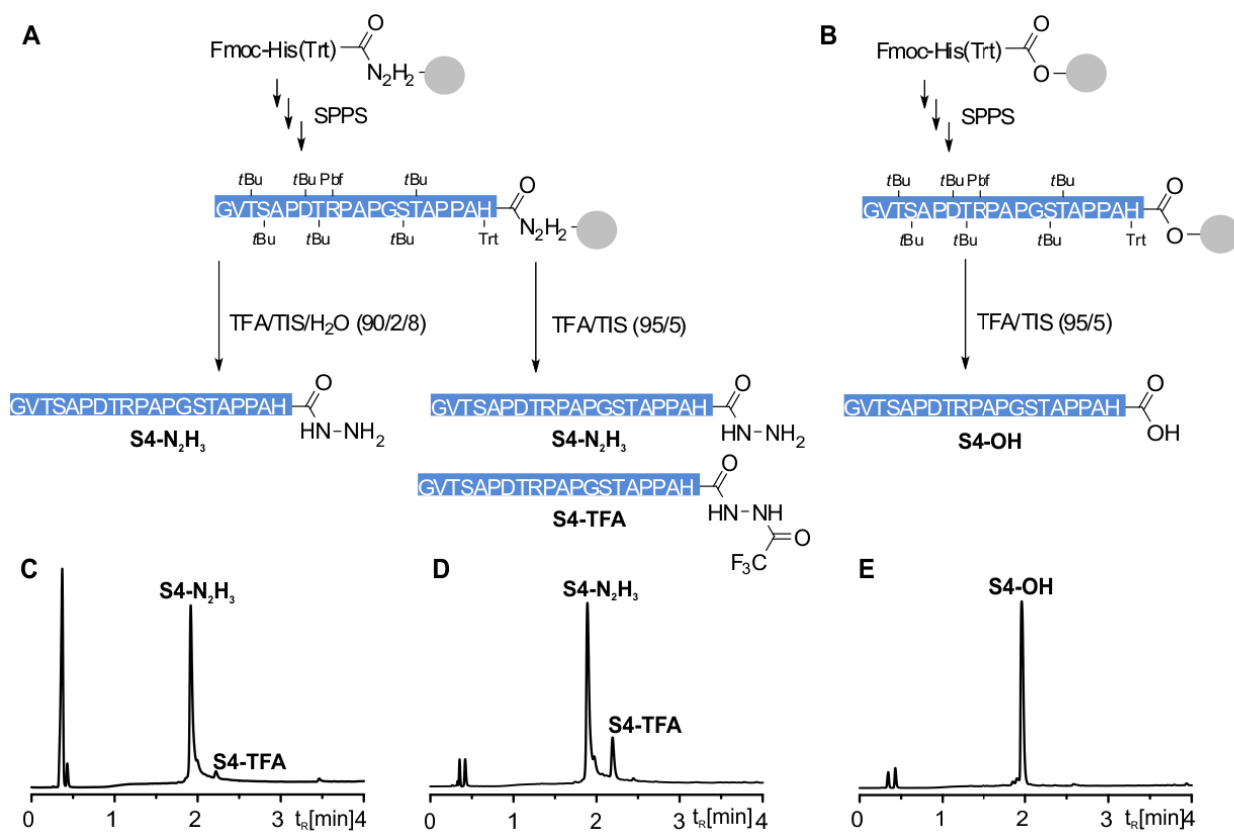


Abbildung 106: Trifluoracetylierung von C-terminalen Peptidhydraziden (A): UPLC-Analyse der erhaltenen Rohprodukte nach der Abspaltung mit TFA/TIS/H₂O (90/2/8, v/v/v) (C) und mit TFA/TIS (95/5, v/v) (D). TFA-Behandlung einer sequenzanalogen Peptidsäure (A'): UPLC-Analyse des erhaltenen Rohproduktes nach der Abspaltung mit TFA/TIS (95/5, v/v) (E).

6.15.6. Optimierung der Peptidligation an der festen Phase

200 μL eines Ni-NTA-Agaroseharzes (50%ige Suspension, *Cube Biotech, Germany*) wurden in einen Spritzenreaktor überführt. Die Lösung wurde abgetrennt und das Harz in 200 μL eines wässrigen Puffers (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5) gequollen (2 min). Anschließend wurde der wässrige Puffer abgetrennt. Das Rohprodukt des 46 Aminosäuren-langen His₆-MUC1-Peptidthioesters **161b** (ca. 200 nmol) wurden in 100 μL eines wässrigen Puffers (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5) gelöst und auf das Harz gegeben. Nach der Immobilisierung (ca. 15 min) wurde der Puffer entfernt und das Harz gewaschen (5 x 200 μL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5)). Im nächsten Schritt erfolgte die SPCL-Reaktion durch Zugabe des Auxiliärpeptids **162b** (1-2.5 Äq.), welches bei ca. 12mM Konzentration in unterschiedlichen Ligationspuffern gelöst wurde (siehe Tabelle, Abbildung 106). Der Spritzenreaktor wurde mit Argon überschichtet, verschlossen und stark geschüttelt. Nach 24 h wurde die Ligationlösung entfernt und das Harz gewaschen (5 x 200 μL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5), 3 x 200 μL Wasser). Zur Analyse der SPCL-Reaktion wurde eine geringe Menge des erhaltenen Harzes (ca. 2 mg) für 10 min mit einer wässrigen Imidazol-Lösung (100 mM, pH 8.5) behandelt. Die Lösung wurde abgetrennt, zentrifugiert, durch Zugabe von 0.1% TFA angesäuert und mit Hilfe der UPLC-Analyse untersucht. Die Ausbeute der SPLC-Reaktion wurde durch Integration der Peakflächen des UPLC-Chromatogrammes ($\lambda = 210 \text{ nm}$) unter Berücksichtigung der molaren Extinktionskoeffizienten, nach Gruppen *et al.*,^[113] berechnet.

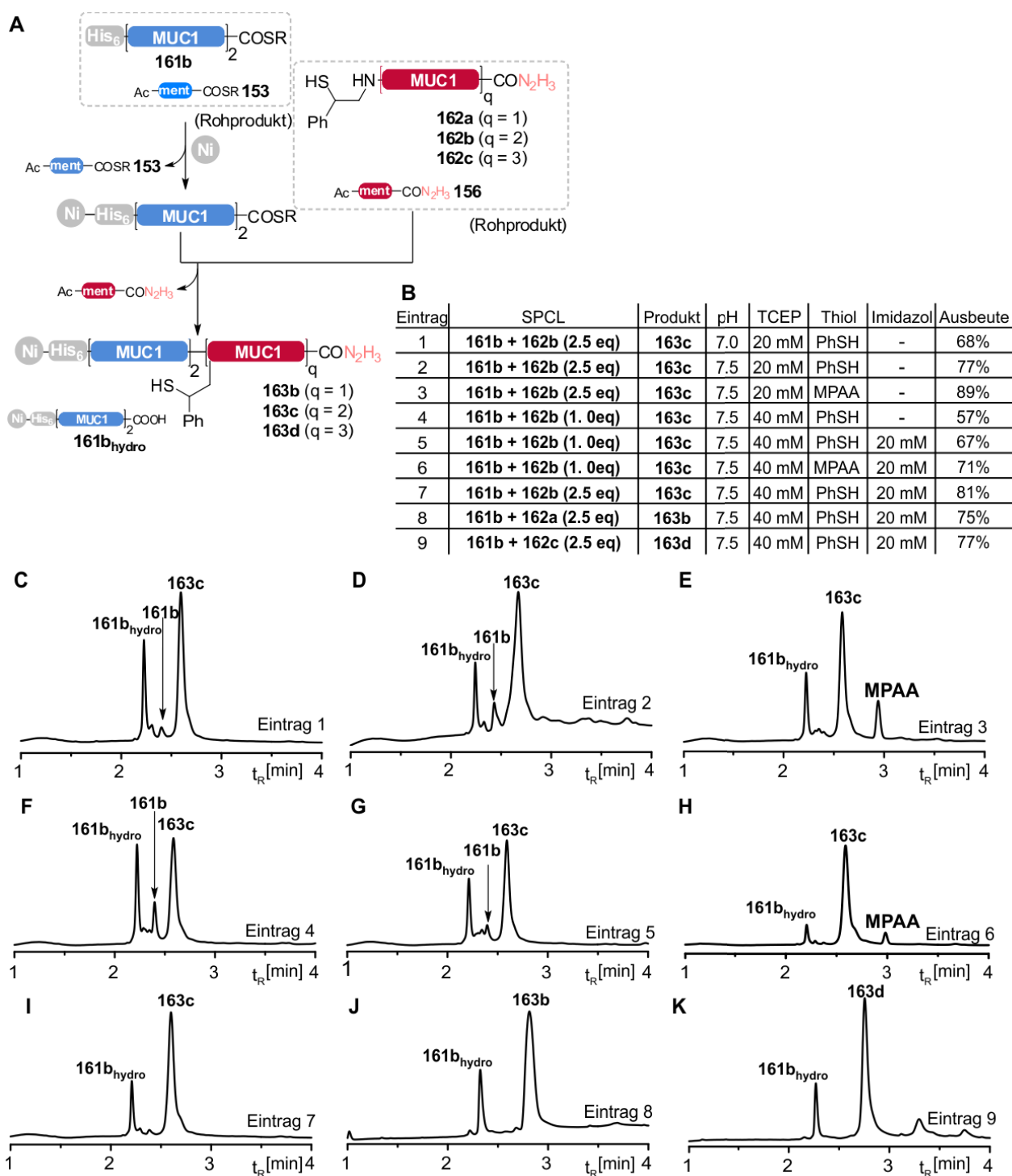


Abbildung 107: Reinigung des His₆-MUC1-Peptidthioesters **161b** durch Affinitätschromatographie und anschließende Peptidligation auf der Festphase mit den Rohprodukten der Auxiliarpeptide **162a-c** (A): Tabellarische Übersicht der untersuchten SPCL-Reaktionen und den ermittelten Ausbeuten (B). UPLC-Analysen der Eluate, welche im Anschluss an die SPCL durch Behandlung der Ligationsprodukt-tragenden Ni-NTA-Harze mit 0.1 M wässriger Imidazol-Lösung (pH 8.5) erhalten wurden (C-K). Immobilisierung: Rohprodukt von **161b** in wässrigem Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄, pH 7.5); Ligation: Rohprodukt von **162a-c** in wässrigem Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na₂HPO₄), Bedingungen wie in Tabelle (B) angegeben; Thiol: PhSH = 2 Vol.-% PhSH; MPAA = 50 mM.

6.15.7. Protokoll für die HPLC-freie Synthese der MUC1-Proteine

Immobilisierung auf dem Ni-NTA-Agaroseharz: 200 μL eines Ni-NTA-Agaroseharzes (50%ige Suspension, *Cube Biotech, Germany*) wurden in einen Spritzenreaktor überführt. Die Lösung wurde abgetrennt und das Harz in 100 μL eines wässrigen Puffers (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5) gequollen (2 min). Anschließend wurde der wässrige Puffer abgetrennt. Die Rohprodukte der His₆-MUC1-Peptidthioesters **161a-c** (ca. 500 nmol) wurden in je 100 μL eines wässrigen Puffers (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5)) gelöst und auf das Harz gegeben. Nach der Immobilisierung (ca. 15 min) wurde der Puffer entfernt und das Harz gewaschen (5 x 200 μL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5)).

SPCL: Die Rohprodukte der Auxiliärpeptidhydrazide **162a-c** (ca. 1.5 μmol) wurden in 100 μL eines wässrigen Puffers (20 mM TCEP, 20 mM Imidazol, 6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , 2 Vol.-% PhSH, pH 7.5) gelöst und auf die Harz-gebundenen Peptidthioester gegeben. Der Spritzenreaktor wurde mit Argon überschichtet, verschlossen und stark geschüttelt. Nach 24 h wurde die Ligationslösung entfernt und das Harz gewaschen (5 x 200 μL wässriger Puffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5), 3 x 200 μL Wasser).

Auxiliar-Abspaltung: Das Harz-gebundene Ligationsprodukt wurde mit 1.0 mL einer wässrigen Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) bei 40°C behandelt. Nach 24 h wurde die Lösung abgetrennt und durch Zugabe von 1 M HCl auf pH 7 eingestellt. Die erhaltene Lösung wurde auf den Ni-NTA-Harz gegeben und dabei die gelösten MUC1-Proteine, welche um Zuge der Auxiliar-Abspaltungsreaktion teilweise aus Harz verdrängt wurden, reimmobilisiert (15-30 min). Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz gewaschen (5 x 200 μL Wasser). *Anmerkung:* Die Auxiliar-Abspaltung konnte auch erfolgreich bei Raumtemperatur durchgeführt werden, indem eine wässrige Lösung von TCEP (0.4 M) und Morpholin (1.6 M) verwendet wurde.

Elution der MUC1-Proteine vom Ni-NTA-Agaroseharz: Die Harz-gebundenen MUC1-Proteine wurden mit wässriger Essigsäure (0.25 M, mit 1 M HCl auf pH 3.6 eingestellt) behandelt (8 x 500 μL , 8 x 5 min). Die erhaltenen Lösungen wurden vereint. *Anmerkung:* Durch Verwendung eines wässrigen Puffers (2.0 M AcOH/NaOAc, pH 3.6, 4 x 500 μL , 4 x 10 min) konnte eine höhere Konzentration der MUC1-Proteine im Eluat erhalten werden. Diese Variante könnte von Vorteil sein, um eine schnellere Immobilisierung auf dem Aldehyd-funktionalisierten Agaroseharz zu ermöglichen.

Immobilisierung auf dem Aldehyd-funktionalisierten Agaroseharz: 200 μL eines Aldehyd-funktionalisierten Agaroseharzes (20%ige Suspension in Ethanol, ABT, Madrid) wurden in einen Spritzenreaktor überführt. Die Lösung wurde abgetrennt. Die vereinigten essigsauren Lösungen wurden auf das Aldehyd-funktionalisierte Agaroseharz gegeben. Nach 30 min wurde die Lösung entfernt und das Harz gewaschen (10 x 200 μL wässriger Puffer (6 M GuHCl , 200 mM Na_2HPO_4 , pH 7.5), 5 x 200 μL Wasser).

Finale Freisetzung der MUC1-Proteine: Das Harz wurde mit einer wässrigen Hydrazin-Lösung (0.5 Vol.-%) behandelt (3 x 500 μL , 3 x 5 min). Die vereinigten Lösungen wurden mit TFA (15 μL) versetzt und anschließend gefriergetrocknet. Dabei wurden die MUC1-Proteine als weiße Feststoffe erhalten. *Anmerkung:* Die MUC1-Proteine konnten auch durch Verwendung einer 1% TFA-Lösung freigesetzt werden (4 x 1 mL, 4 x 30 min).

6.15.8. Anwendung der HPLC-freien Proteinsynthese

161b + **162b** → **163c** (86 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163c**, 1.04 mg, 104 nmol (21%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163c** als 15-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.4$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1191.1$ ($(M+7H)^{7+}$, ber.: 1190.9 (100%)), 1042.7 ($(M+8H)^{8+}$, ber.: 1042.1 (100%)), 926.9 ($(M+9H)^{9+}$, ber.: 926.5 (100%)), 834.4 ($(M+10H)^{10+}$, ber.: 833.9 (100%)), 759.7 ($(M+11H)^{11+}$, ber.: 758.2 (100%)), 695.5 ($(M+12H)^{12+}$, ber.: 695.1 (100%)), 642.2 ($(M+13H)^{13+}$, ber.: 641.7 (100%)); MALDI-MS: 8331.6 ($(M+1H)^{1+}$, ber.: 8332.0), 4167.0 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 4166.5); Summenformel: $C_{356}H_{546}N_{120}O_{114}$ (MW = 8331.0 g·mol⁻¹).

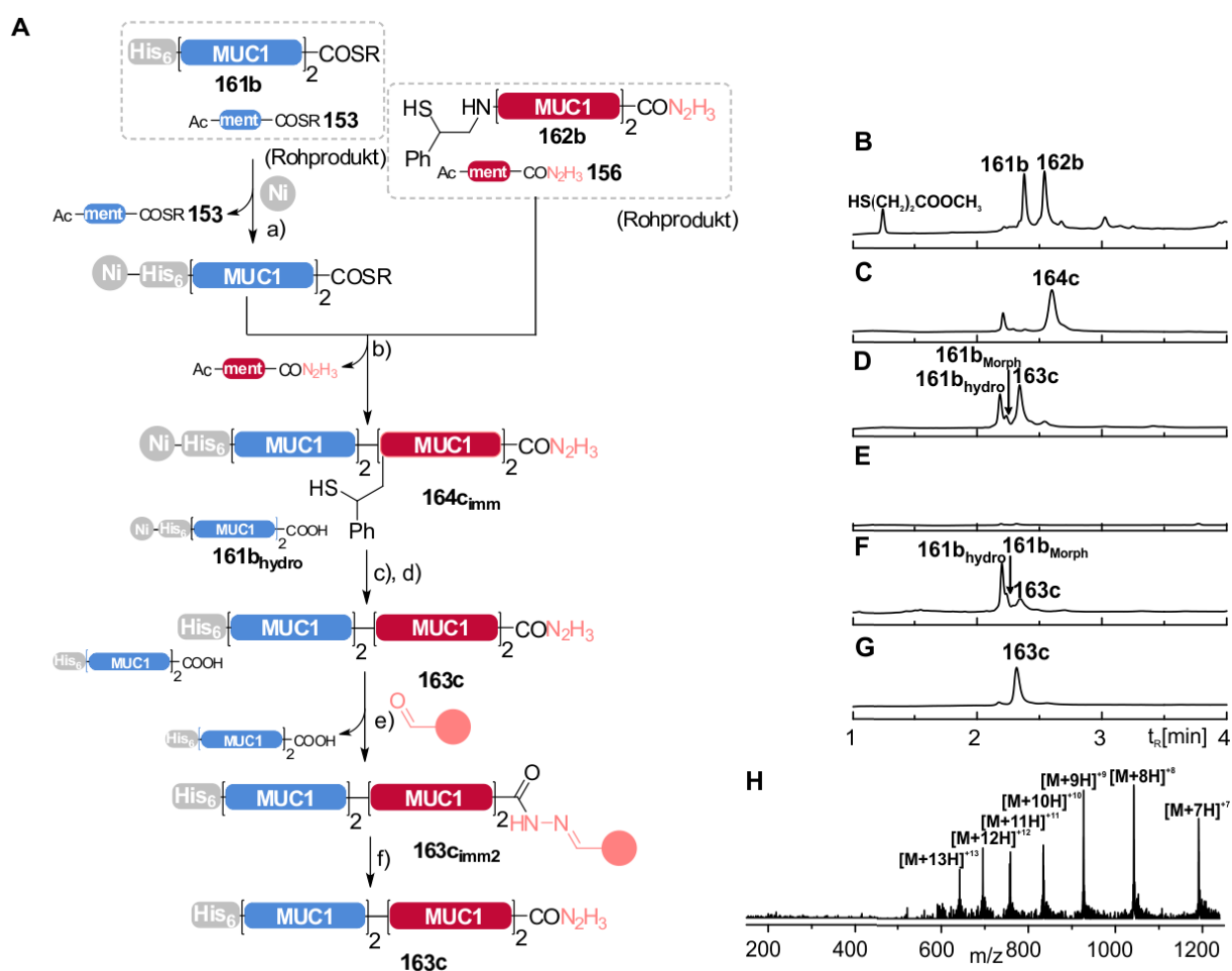


Abbildung 108: HPLC-freie Reinigung des MUC1-Proteins **163c** (A). UPLC-Analysen der beiden Rohprodukte **161b** und **162b** (B, Koinjektion), des Eluates nach der SPLC-Reaktion (C), vor (D) und nach (E) Immobilisierung nach auf dem Aldehyd-funktionalisierten Agarose-Harz, der Waschlösung (F) und des gereinigten MUC1-Proteins **163c** (G). Bedingungen: siehe oben; **161b_{Morph}**: Aminolyseprodukt von **161b** und Morpholin.

161a + 162a → 163a (46 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163a**, 0.98 mg, 167 nmol (23%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163a** als 11-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 1.9$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1149.2$ ((M+4H)⁴⁺, ber.: 1149.2 (100%)), 919.6 ((M+5H)⁵⁺, ber.: 919.5 (100%)), 766.6 ((M+6H)⁶⁺, ber.: 766.4 (100%)), 657.3 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 657.0 (100%)), 575.2 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 575.0 (100%)); MALDI-MS: 4592.5 ((M+1H)¹⁺, ber.: 4594.0); Summenformel: C₁₉₆H₂₉₆N₇₀O₆₀ (MW = 4593.0 g·mol⁻¹).

161a + 162b → 163b (66 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163b**, 0.55 mg, 69.2 nmol (14%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163b** als 13-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.1$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1077.9$ ((M+6H)⁶⁺, ber.: 1077.9 (100%)), 924.2 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 924.0 (100%)), 808.9 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 808.7 (100%)), 718.9 ((M+9H)⁹⁺, ber.: 718.9 (100%)), 647.3 ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 647.1 (100%)), 588.7 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 588.3 (100%)); MALDI-MS: 6462.1 ((M+1H)¹⁺, ber.: 6463.0); Summenformel: C₂₇₆H₄₂₁N₉₅O₈₇ (MW = 6462.0 g·mol⁻¹).

161a + 162c → 163c (86 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163c**, 0.87 mg, 86.6 nmol (17%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163c** als 15-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.1$ min (3-40% B in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1191.2$ ((M+7H)⁷⁺, ber.: 1190.9 (100%)), 1042.4 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 1042.1 (100%)), 926.8 ((M+9H)⁹⁺, ber.: 926.5 (100%)), 834.4 ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 833.9 (100%)), 758.6 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 758.2 (100%)), 695.4 ((M+12H)¹²⁺, ber.: 695.1 (100%)), 642.1 ((M+13H)¹³⁺, ber.: 641.7 (100%)); MALDI-MS: 8331.3 ((M+1H)¹⁺, ber.: 8332.0); Summenformel: C₃₅₆H₅₄₆N₁₂₀O₁₁₄ (MW = 8331.0 g·mol⁻¹).

161b + 162a → 163b (66 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163b**, 0.73 mg, 91.9 nmol (18%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163b** als 13-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.0$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1078.0$ ((M+6H)⁶⁺, ber.: 1077.9 (100%)), 924.3 ((M+7H)⁷⁺, ber.: 924.0 (100%)), 808.9 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 808.7 (100%)), 719.1 ((M+9H)⁹⁺, ber.: 718.9 (100%)), 647.4 ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 647.1 (100%)), 588.6 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 588.3 (100%)); MALDI-MS: 6462.8 ((M+1H)¹⁺, ber.: 6463.0), 3231.8 ((M+2H)²⁺, ber.: 3232.0); Summenformel: C₂₇₆H₄₂₁N₉₅O₈₇ (MW = 6462.0 g·mol⁻¹).

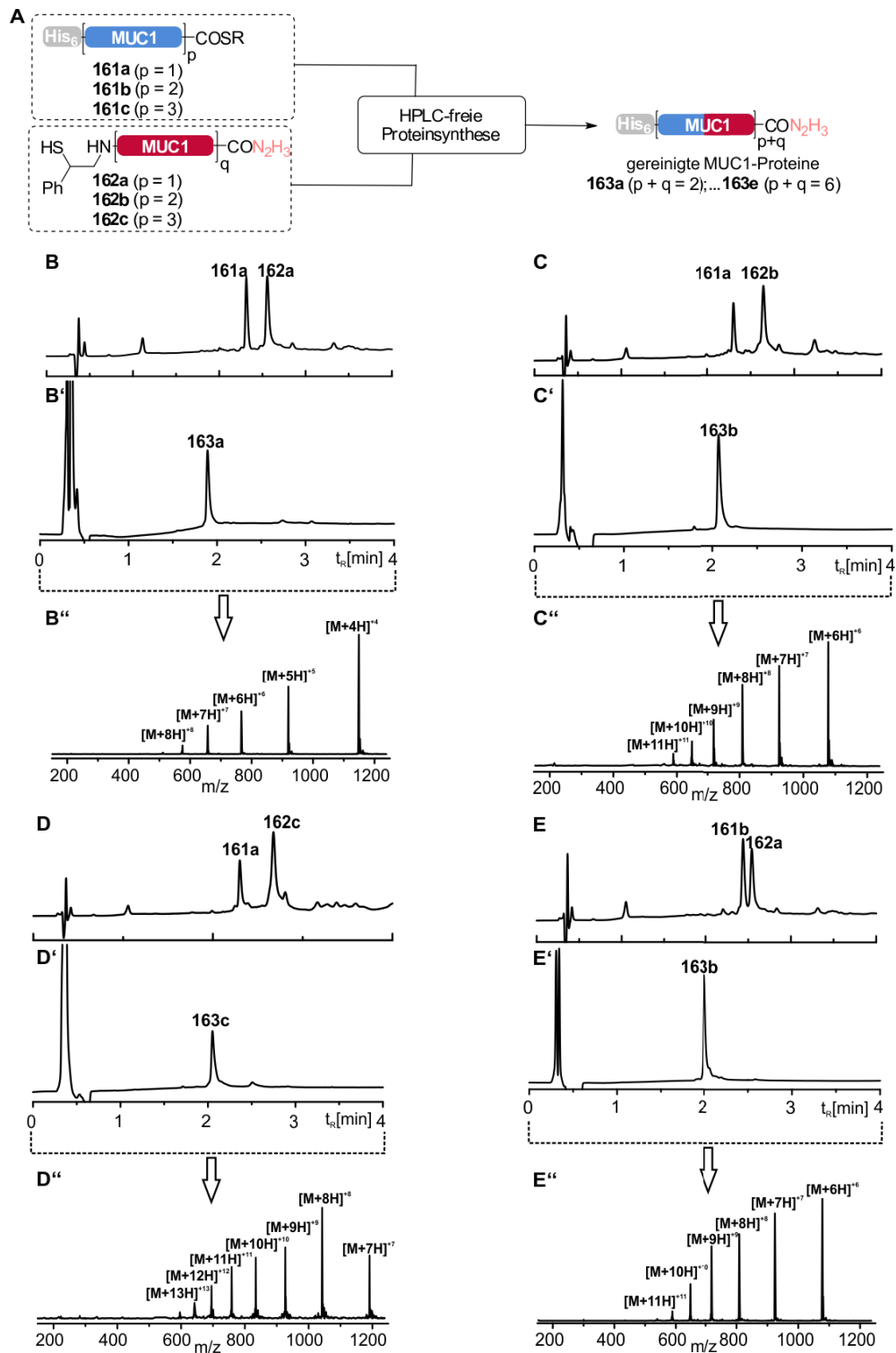


Abbildung 109: Anwendung der HPLC-freien Proteinsynthese (A): UPLC-Analysen der beiden Proteinfragmente (B-E, Koinjektion der Rohprodukte) und der gereinigten MUC1-Proteine (B'-E'). ESI-MS-Analysen der gereinigten MUC1-Proteine (B''-E'').

$161b + 162c \rightarrow 163d$ (106 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163d**, 0. 54 mg, 44.4 nmol (9%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163d** als 17-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1134.4$ ((M+9H)⁹⁺, ber.: 1134.2 (100%)), 1021.1 ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 1020.9 (100%)), 928.5 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 928.2 (100%)), 851.2 ((M+12H)¹²⁺, ber.: 850.9 (100%)), 785.9 ((M+13H)¹³⁺, ber.: 785.5 (100%)), 729.7 ((M+14H)¹⁴⁺, ber.: 729.5 (100%)), 681.1 ((M+15H)¹⁵⁺, ber.: 680.9 (100%)), 638.2 ((M+16H)¹⁶⁺, ber.: 638.4 (100%)); MALDI-MS: 10199.6 ((M+1H)¹⁺, ber.: 10201.0), 5102.8 ((M+2H)²⁺, ber.: 5101.0); Summenformel: C₄₃₆H₆₇₁N₁₄₅O₁₄₁ (MW = 10200.0 g·mol⁻¹).

161c + 162a → **163c** (86 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163c**, 0. 74 mg, 73.2 nmol (15%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163c** als 15-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.0$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1191.2$ ((M+7H)⁷⁺, ber.: 1190.9 (100%)), 1042.4 ((M+8H)⁸⁺, ber.: 1042.1 (100%)), 926.8 ((M+9H)⁹⁺, ber.: 926.5 (100%)), 834.3 ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 833.9 (100%)), 758.6 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 758.2 (100%)), 695.5 ((M+12H)¹²⁺, ber.: 695.1 (100%)), 642.0 ((M+13H)¹³⁺, ber.: 641.7 (100%)), 596.0 ((M+14H)¹⁴⁺, ber.: 595.9 (100%)); MALDI-MS: 8332.3 ((M+1H)¹⁺, ber.: 8332.0); Summenformel: C₃₅₆H₅₄₆N₁₂₀O₁₁₄ (MW = 8331.0 g·mol⁻¹).

161c + 162b → **163d** (106 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163d**, 0. 51 mg, 42.0 nmol (8%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163d** als 17-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.1$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1134.5$ ((M+9H)⁹⁺, ber.: 1134.2 (100%)), 1021.1 ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 1020.9 (100%)), 928.4 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 928.2 (100%)), 851.2 ((M+12H)¹²⁺, ber.: 850.9 (100%)), 785.9 ((M+13H)¹³⁺, ber.: 785.5 (100%)), 729.9 ((M+14H)¹⁴⁺, ber.: 729.5 (100%)), 681.0 ((M+15H)¹⁵⁺, ber.: 680.9 (100%)), 638.9 ((M+16H)¹⁶⁺, ber.: 638.4 (100%)); MALDI-MS: 10200.2 ((M+1H)¹⁺, ber.: 10201.0), 5102.0 ((M+2H)²⁺, ber.: 5101.0); Summenformel: C₄₃₆H₆₇₁N₁₄₅O₁₄₁ (MW = 10200.0 g·mol⁻¹).

161c + 162b → **163e** (126 Aminosäuren langes MUC1-Protein **163e**, 1.08 mg, 85.3 nmol (17%, bezogen auf die Erstbeladung des SPPS-Harzes; Annahme: **163e** als 19-faches TFA-Salz).

UPLC-MS: $t_R = 2.2$ min (3-40% D in 4 min, CSH-Säule); $m/z = 1208.1$ ((M+10H)¹⁰⁺, ber.: 1207.7 (100%)), 1098.4 ((M+11H)¹¹⁺, ber.: 1098.0 (100%)), 1006.8 ((M+12H)¹²⁺, ber.: 1006.6 (100%)), 929.5 ((M+13H)¹³⁺, ber.: 929.9 (100%)), 863.3 ((M+14H)¹⁴⁺, ber.: 862.9 (100%)), 805.9 ((M+15H)¹⁵⁺, ber.: 805.5 (100%)), 755.6 ((M+16H)¹⁶⁺, ber.: 755.2 (100%)), 711.3 ((M+17H)¹⁷⁺, ber.: 710.8 (100%)), 671.2 ((M+18H)¹⁸⁺, ber.: 671.4 (100%)); MALDI-MS: 12069.5 ((M+1H)¹⁺, ber.: 12069.9), 6035.6

$((M+2H)^{2+}$, ber.: 6035.5), 4025.5 $((M+3H)^{3+}$, ber.: 4024.0); Summenformel: $C_{516}H_{796}N_{170}O_{168}$ (MW = 12068.9 g·mol⁻¹).

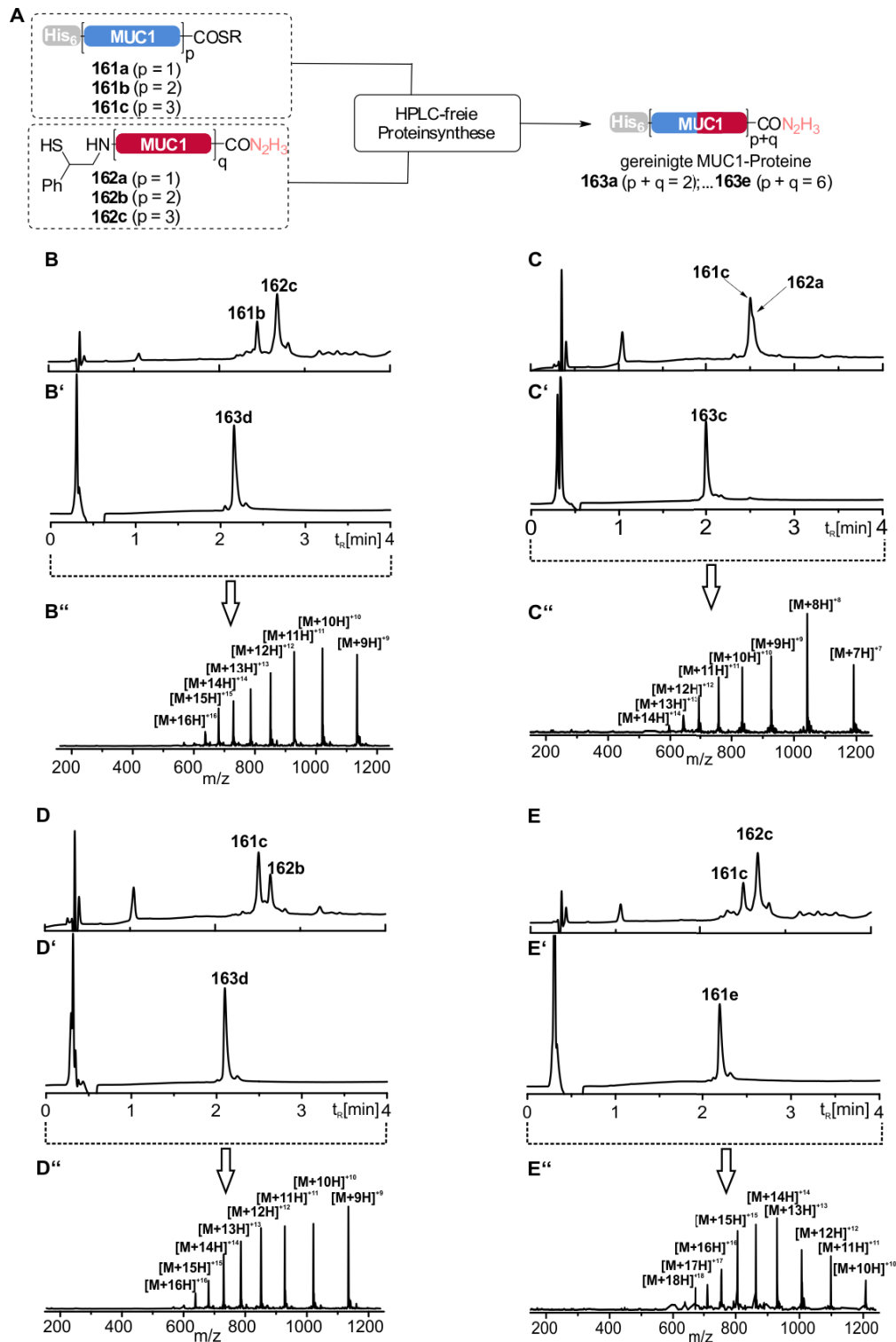


Abbildung 110: Anwendung der HPLC-freien Proteinsynthese (A): UPLC-Analysen der beiden Proteinfragmente (B-E, Koinjektion der Rohprodukte) und der gereinigten MUC1-Proteine (B'-E'). ESI-MS-Analysen der gereinigten MUC1-Proteine (B''-E'').

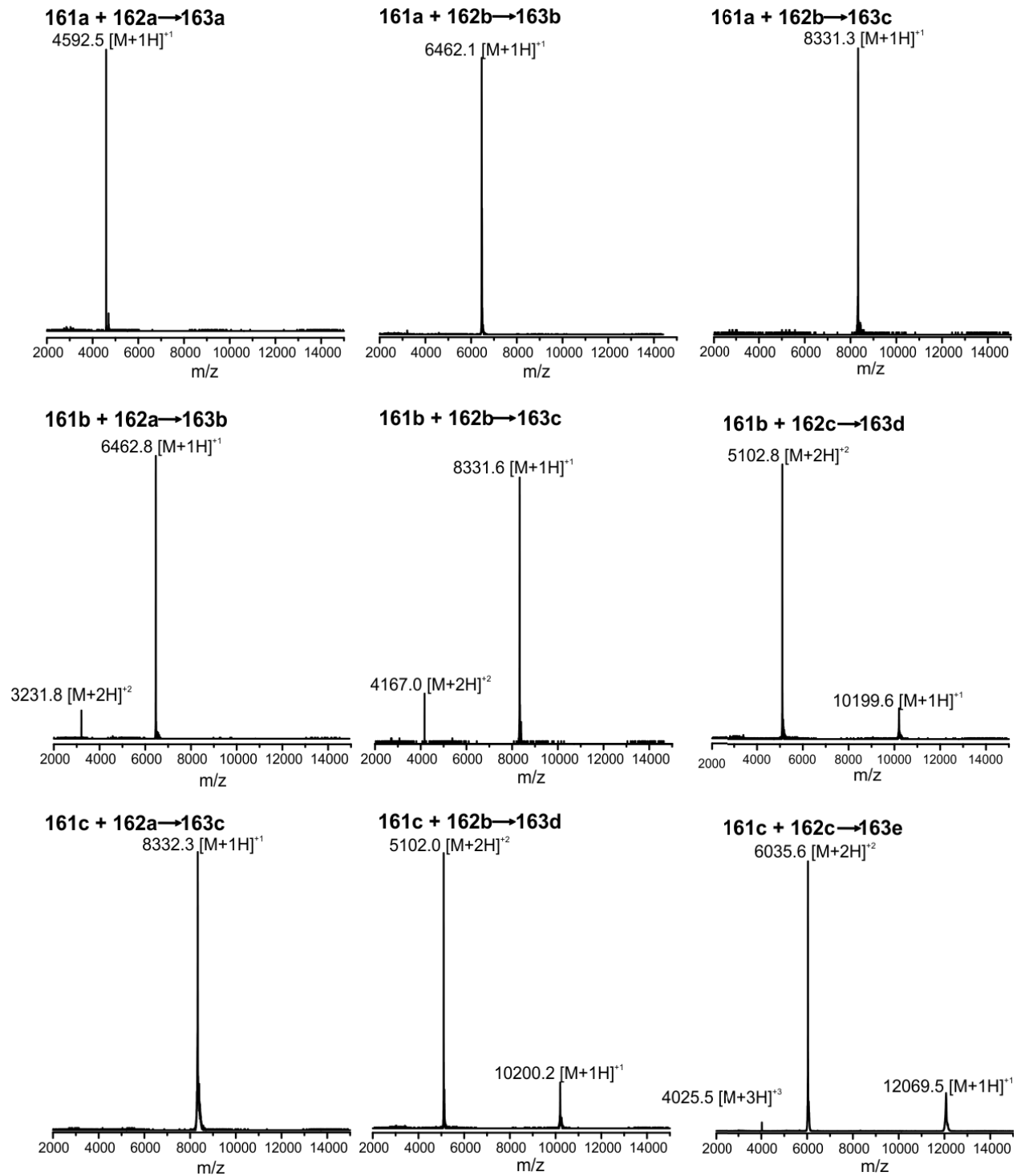


Abbildung 111: MALDI-MS-Analysen der gereinigten MUC1-Proteine.

6.15.9. Reinigung durch Reaktivitätsmarkierung als Alternative zur HPLC-basierten Reinigung

In der Reaktion des Peptidthioesters **161c** mit dem Auxiliärpeptid **161a** offenbarte die UPLC-Analyse ein schwieriges Trennproblem: Das Hydrolyseprodukt des Peptidthioesters **161c_{hydro}** eluiert fast zeitgleich mit dem nativen MUC1-Protein **163c**. Eine HPLC-basierte Reinigung des Ligationsproduktes wäre vermutlich ohne Erfolg verlaufen. Im Gegensatz dazu können derartige Trennprobleme auf einfache Weise durch Anwendung von Affinitätschromatographie gelöst werden.

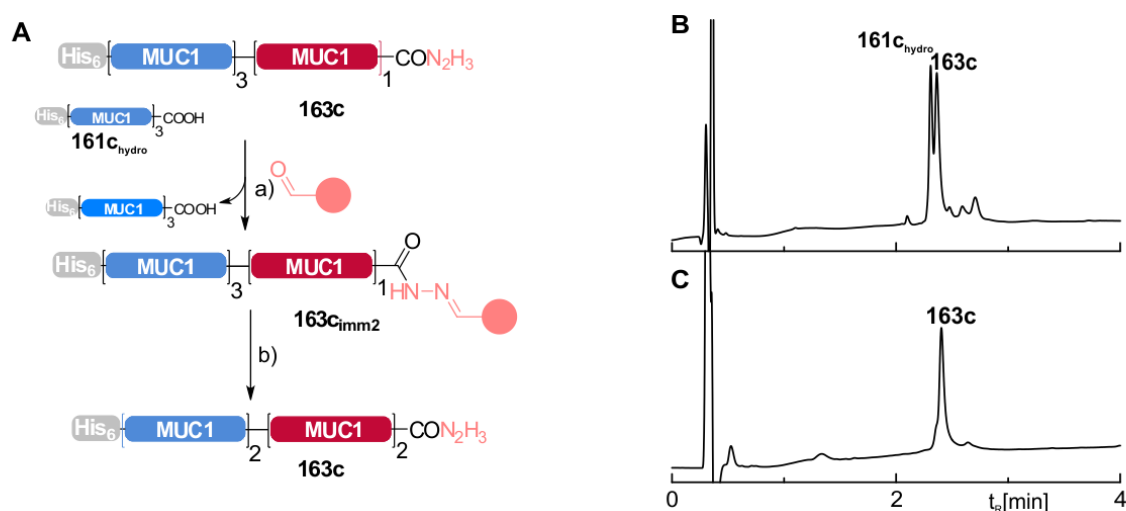


Abbildung 112: HPLC-freie Reinigung des MUC1-Proteins **163c** (A): UPLC-Analyse des Rohproduktes vor der Immobilisierung auf dem Aldehyd-funktionalisierten Agarose-Harz (B) und des gereinigten MUC1-Proteins **163c** (C). Bedingungen: a) Elution: 0.25 M AcOH, pH 3.6, RT; b) 0.5 Vol.-% N₂H₄ in Wasser, RT.

6.16. Synthese und Anwendung des 2SPE-Auxiliars

6.16.1. Synthese des 2SPE-Auxiliar-Vorläufermoleküls

Synthese über das Weinrebamid **81**

Diselenid **169**

Hinweis: Bei der Synthese entsteht möglicherweise Cyanid/Cyanat. Die Arbeiten sollten daher mit größter Sorgfalt erfolgen und die wässrigen Waschlösungen fachgerecht entsorgt werden.

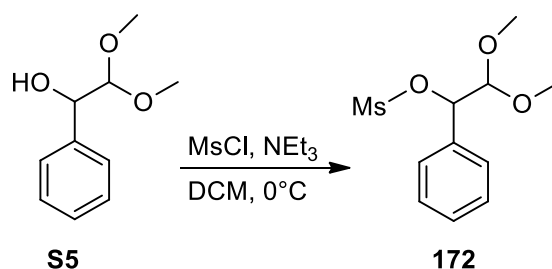
Paramethoxybenzylselenocyanat^[114] (2.90 g, 12.8 mmol) wurde in THF (26 mL) gelöst und mit KOH (899 mg, 16.0 mmol) versetzt. Nach 30 Min wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (24 mL) und Diethylether (25 mL) versetzt und die wässrige Phase abgetrennt. Die organische Phase wurde mit wässriger ges. NaHCO₃-Lösung (25 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und dabei das gewünschte Diselenid **169** (2.49 g, 6.21 mmol, 97%) erhalten.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.19–7.14 (m, 2H), 6.86–6.85 (m, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.80 (m, 3H).

Versuch zur Synthese des Selenoethers **167**

Das Diselenid **169** (466 mg, 1.77 mmol) wurde in einem THF-Methanol-Gemisch (1/1, v/v) gelöst und bei 0°C portionsweise NaBH₄ (88.0 mg, 2.33 mmol) zugegeben. Dabei wurde ein Farbumschlag von gelb zu farblos beobachtet (~ 5 min, Reduktion des Diselenids). Anschließend wurde eine Lösung des Bromid **81** (500 mg, 1.94 mmol) in THF (2.5 mL) zugetropft. Nach 18 h wurde das Reaktionsgemisch mit einer wässrigen NaOH-Lösung (1 Gew.-%, 10 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 2/1, v/v). Das gewünschte Produkt **167** konnte auf diesem Wege nicht isoliert werden.

Synthese über das Dimethoxyacetal 173



Synthese des Mesylats 172

Das α -Hydroxyacetal **S5**^[115] (350 mg, 1.92 mmol) wurde in DCM (3.5 mL) gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde Triethylamin (290 mg, 398 μ L, 2.88 mmol) und tropfenweise Methansulfonsäurechlorid (264 mg, 178 μ L, 2.30 mmol) zugegeben. Nach zwei Stunden wurde das Reaktionsgemisch mit DCM (20 mL) und einer wässrigen ges. NH_4Cl -Lösung (20 mL) versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt, gewaschen (1 x Wasser (20 mL), 1 x wässrige ges. NaCl -Lösung (20 mL)) und über MgSO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und dabei das gewünschte Mesylat **172** (470 mg, 1.81 mmol, 94%) erhalten.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.45–7.39 (m, 5H), 5.46–5.44 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 4.61–4.59 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.31 (s, 3H), 2.85 (s, 3H).

Nukleophile Substitution am Mesylat 172

Das Mesylat **172** (320 mg, 1.23 mmol) wurde mit 18-Krone-6 (7 mg, 0.03 mmol) in THF (7 mL) gelöst. Anschließend wurde KSeCN (354 mg, 2.46 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch unter Rückfluss erhitzt. Nach neun Stunden wurde die Lösung abgekühlt, mit Diethylether (50 mL) versetzt und die organische Phase zweimal mit einer wässrigen ges. NaHCO_3 -Lösung (25 mL) gewaschen. Die wässrigen Lösungen wurden einmal mit Diethylether (50 mL) reextrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereint, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 3/1, v/v). Dabei wurde das Startmaterial **172** erhalten.

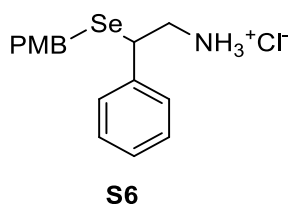
Synthese des Selenoesters 178

Das Diselenid **169** (650 mg, 1.62 mmol) wurde in Ethanol (16 mL) unter Argon-Atmosphäre gelöst und bei 0°C portionsweise NaBH₄ (245 mg, 6.47 mmol) zugegeben. Nach 10 Min wurde das Bromid **177**^[109] (972 mg, 3.24 mmol) zugetropft und anschließend weiteres NaBH₄ (123 mg, 3.24 mmol) hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde nochmals NaBH₄ (62 mg, 1.62 mmol) hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde das Reaktionsgemisch mit Wasser (30 mL) versetzt und anschließend mit Chloroform (2 x 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat = 5/1, v/v). Dabei wurde der gewünschte Selenoether **178** (747 mg, 1.78 mmol, 55%) als gelbliches Öl erhalten.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.26–7.23 (m, 2H), 7.19–7.17 (m, 3H), 7.09–7.08 (m, 2H), 6.74–6.72 (m, 2H), 4.60 (s, 1H), 3.97–3.94 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.68–3.59 (m, 3H), 3.53–3.48 (m, 1H), 1.34 (s, 9H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 158.6, 140.56, 130.8, 130.2, 128.9, 128.2, 127.5, 114.0, 79.6, 55.4, 45.7, 43.7, 28.5, 27.7.

Synthese des PMB-Se-geschützten 2-Selenol-phenethylamins **S6**



Der Selenoester **178** (730 mg, 1.74 mmol) wurde in 4 M HCl in Dioxan (5 mL) gelöst. Nach 30 min wurden die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt und dabei das gewünschte Hydrochlorid **S6** (502 mg, 1.41 mmol, 81%) als gelber Feststoff erhalten. Anmerkung: Das Hydrochlorid **S6** wurde vor dessen Einsatz in der SPPS in das freie Amin **179** überführt (siehe Kapitel 6.16.2.)

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.38 - 7.35 (m, 2H), 7.31 - 7.29 (m, 3H), 7.17 - 7.14 (m, 2H), 6.83 - 6.80 (m, 2H), 4.11 - 4.07 (m, 1H), 3.80 - 3.71 (m, 5H), 3.49 - 3.45 (m, 1H), 3.37 - 3.33 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 160.3, 139.9, 131.5, 131.2, 130.3, 129.3, 129.0, 115.0, 55.7, 45.1, 41.0, 28.8.

6.16.2. Synthese des 2SPE-Auxiliarpeptids

Synthese des Harz-gebundenen Peptids **180**:

Die Kupplung der Bromessigsäure erfolgte nach einer Methode von *Kent et al.*:^[8] Bromessigsäure (104 mg, 750 μmol) wurde in DCM (750 μL) gelöst und mit Diisopropylcarbodiimid (47.3 mg, 58.1 μL , 375 μmol) versetzt. Nach zwei Stunden wurde die Lösung filtriert, das Filtrat auf das Harz-gebundene Peptid (**18**) (25 μmol , zuvor in DCM gequollen) gegeben und der Spritzenreaktor geschüttelt. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgetrennt und das Harz gewaschen (5 x DCM, 5 x DMF).

Synthese des 2SPE-Auxiliarpeptids **182**:

Das Hydrochlorid **S6** (178 mg, 574 μmol) wurde in DCM (5 mL) gelöst und die organische Phase mit einer wässrigen ges. NaHCO_3 -Lösung (3 x 2 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter reduzierten Druck entfernt. Dabei wurde das Amin **179** (144 mg, 526 μmol , 92%) als gelbes Öl erhalten. Der Rückstand wurde in DMF (1 mL) gelöst und DIPEA (96.7 mg, 128 μL , 750 μmol) zugegeben. Anschließend wurde die Hälfte der erhaltenen Lösung auf das Harz-gebundene Peptid **180** (25 μmol , in DMF gequollen) gegeben und der Spritzenreaktor geschüttelt. Nach 16 h wurde die Lösung abgetrennt und das Harz gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Die Abspaltung des PMB-Segeschützten Auxiliarpeptids **181** vom Harz und die Entfernung der PMB-Schutzgruppe orientierte sich an einer Vorschrift von *Fujii et al.*:^[116] Dazu wurde das Harz mit einer TFA/Wasser-Lösung (9/1, v/v, 5 mL) behandelt. Nach zwei Stunden wurde die Lösung abgetrennt und im Argon-Strom eingengt (~ 1 mL). Anschließend wurde das Peptid in Diethylether (8 mL) gefällt. Zur Entfernung der PMB-Schutzgruppe wurde das PMB-geschützte Peptid **181** (Rohprodukt) mit einer Suspension von Iod (63.5 mg, 250 μmol) in Wasser/Methanol (5 mL, 1/1, v/v) bei RT behandelt. Nach zwei Stunden wurde das verbleibende Iod aus der Lösung extrahiert (3 x 2 mL Chloroform) und die wässrige Lösung gefriergetrocknet. Die anschließende präparative HPLC-Reinigung (Gradient 3-45% B in 30

min) lieferte das gewünschte Auxiliarpeptid **182** (9.67 mg, 3.76 μmol , 29%, Annahme 4-faches TFA-Salz).

180: UPLC-MS: $t_R = 2.1$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 973.5$ ($(M+H)^+$, ber.: 973.4 (97.3%)), 487.4 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 487.2 (97.3%)); Summenformel: $C_{38}H_{59}BrN_{12}O_{13}$ (MW = 971.9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

181: UPLC-MS: $t_R = 3.4$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 1212.7$ ($(M+H)^+$, ber.: 1212.5), 607.0 ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 606.8); Summenformel: $C_{54}H_{77}N_{13}O_{14}Se$ (MW = 1211.2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

182: UPLC-MS: $t_R = 2.6$ min (3-60% B in 4 min); $m/z = 1091.4$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 1091.4), 728.0 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 728.0); Summenformel: $C_{92}H_{136}N_{26}O_{26}Se_2$ (MW = 2180.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

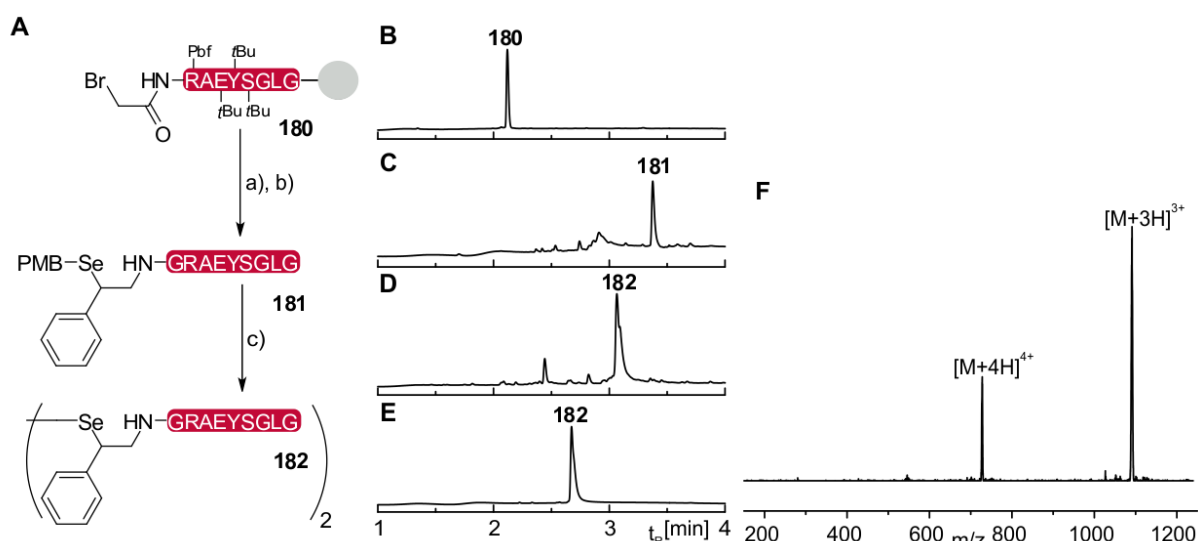


Abbildung 113: Synthese des 2SPE-Auxiliarpeptids **182**: UPLC-Analyse vor (**B**) und nach (**C**) der Einführung des 2SPE-Auxiliars und nach der Entfernung der PMB-Schutzgruppe (**D**). UPLC-(**E**) und ESI-MS-Analyse (**F**) des gereinigten Auxiliarpeptids **182**. Bedingungen: a) **179**, DIPEA, DMF, RT; b) TFA/Wasser (9/1; v/v), RT; c) I_2 in MeOH/Wasser (1/1; v/v), RT, 29% (3 Stufen).

6.16.3. Anwendung des 2SPE-Auxiliars in ENCL-Reaktionen

Peptidligation mit Peptidthioester **22A**

Der Peptidthioester **22A** (250 nmol) und das Auxiliarpeptid **182** (250 nmol) wurden vereint und gefriergetrocknet. Anschließend wurde 50 μL Ligationspuffer (20 mM TCEP, 200 mM Na_2HPO_4 , 3 Vol.-% PhSH, pH 7.5) zugegeben. Unter den Bedingungen wurde das Auxiliarpeptid **182** in das Nebenprodukt **183** umgewandelt (oxidative Deselenierung).

183: UPLC-MS: $t_R = 2.5$ min (3-40% B in 4 min); $m/z = 1028.2$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 1028.5), 515.0 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 514.8); Summenformel: $C_{46}H_{69}N_{13}O_{14}$ (MW = 1028.1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Synthese des Peptidselenoesters 187 (Nach *Payne et al.*^[46])

Das Peptid **S7** wurde an einem Chlorotrityl-Harz (Erstbeladung 25 μmol) aufgebaut (Kapitel 6.4.1.) und durch Behandlung (2 h, RT) mit 30 Vol.-% Hexafluoroisopropanol in DCM (5 mL) als vollständig geschützte Peptidsäure **S8** vom Harz abgespalten. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in DMF (1 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und mit Diphenyldiselenid (234 mg, 150 μL , 750 μmol) versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe einer Lösung von Tributylphosphin (152 mg, 185 μL , 750 μmol) in DMF (1 mL). Nach drei Stunden wurde das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der erhaltene Rückstand mit einer TFA/Wasser/TIS-Lösung (95/2.5/2.5, v/v/v, 5 mL) behandelt. Nach 90 min wurde die Lösung eingengt (~1 mL) und das Rohprodukt in Diethylether (8 mL) gefällt. Die anschließende präparative HPLC-Reinigung (Gradient 3-45% B in 30 min) lieferte den gewünschten Peptidselenoester **187** (4.47 mg, 4.73 μmol , 19%, Annahme 2-faches TFA-Salz, Summenformel: $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{F}_6\text{N}_8\text{O}_{10}\text{Se}$, $\text{MW} = 945.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

187: UPLC-MS: $t_R = 3.1 \text{ min}$ (3-40% B in 4 min); $m/z = 719.4$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 719.3), 360.3 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ber.: 360.1); Summenformel: $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_6\text{Se}$ ($\text{MW} = 717.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

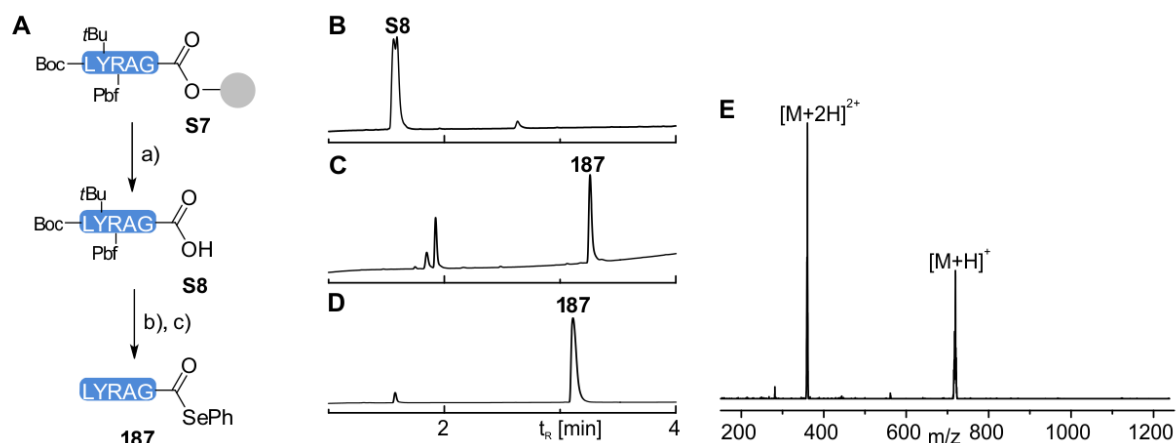


Abbildung 114: Synthese des Peptidselenoesters **187** (A): UPLC-Analyse vor (B) und nach (C) der Bildung des Peptidselenoesters. UPLC-(D) und ESI-MS-Analyse (E) des gereinigten Peptidselenoesters **187**. Bedingungen: a) 30 Vol.-% Hexafluoroisopropanol in DCM, RT; b) $(\text{PhSe})_2$, $n\text{Bu}_3\text{P}$, DMF, 0°C; c) TFA/Wasser/TIS (95/2.5/2.5, v/v/v), RT.

Peptidligation mit Peptidselenoester und Auxiliär-Abspaltung

Der Selenoester **187** (100 nmol) und das Auxiliärpeptid **182** (100 nmol) wurden vereint und gefriergetrocknet. Anschließend wurde 50 μL Ligationspuffer (6 M GuHCl, 200 mM Na_2HPO_4 , pH 6.5) zugegeben und das Reaktionsgemisch bei RT geschüttelt. Nach Ende der Ligation wurde das gebildete Diphenyldiselenid mit Hexan extrahiert ($5 \times 1 \text{ mL}$). Anschließend wurden je 10 μL der Ligationlösung mit 40 μL einer wässrigen Lösung von TCEP (0.2 M) und Morpholin (0.8 M) versetzt und das Reaktionsgemisch bei RT oder 40°C geschüttelt.

Analytische Daten:

186: UPLC-MS: $t_R = 4.00 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 1101.1$ ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 1101.8), 826.8 ($(M+4H)^{4+}$, ber.: 826.6); Summenformel: $\text{C}_{144}\text{H}_{216}\text{N}_{42}\text{O}_{38}\text{Se}_2$ (MW = $3301.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

189: UPLC-MS: $t_R = 3.9 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 915.1$ ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 915.1), 686.6 ($(M+4H)^{4+}$, ber.: 686.3); Summenformel: $\text{C}_{118}\text{H}_{176}\text{N}_{34}\text{O}_{32}\text{Se}_2$ (MW = $2741.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

30: UPLC-MS: $t_R = 2.8 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 735.3$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 734.9); 490.7 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 490.3); Summenformel: $\text{C}_{64}\text{H}_{101}\text{N}_{21}\text{O}_{19}$; (MW = $1468.61 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

88: UPLC-MS: $t_R = 3.5 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 794.9$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 793.9), 530.6 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 529.6); Summenformel: $\text{C}_{72}\text{H}_{106}\text{N}_{20}\text{O}_{21}$.

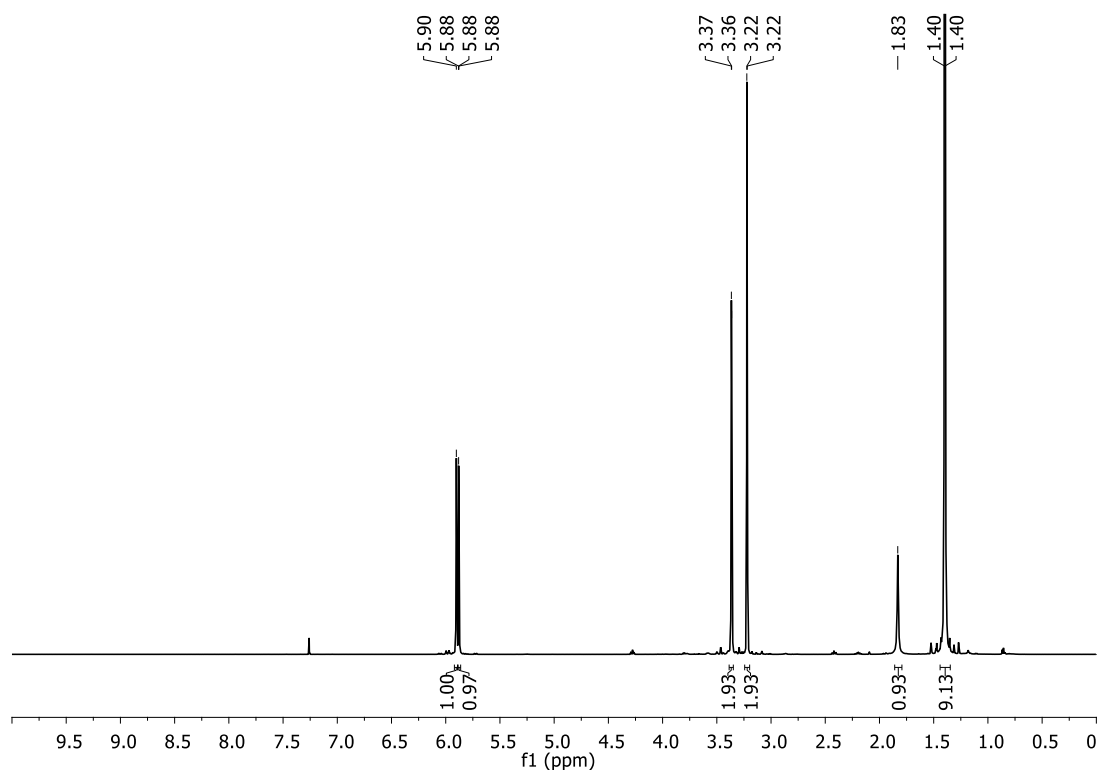
183: UPLC-MS: $t_R = 3.1 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 1028.7$ ($(M+2H)^{2+}$, ber.: 1028.5), 514.9 ($(M+3H)^{3+}$, ber.: 514.8); Summenformel: $\text{C}_{46}\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_{14}$ (MW = $1028.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

42: UPLC-MS: $t_R = 2.4 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 936.6$ ($(M+H)^+$, ber.: 936.5); Summenformel: $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_{13}\text{O}_{14}$ (MW = $936.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

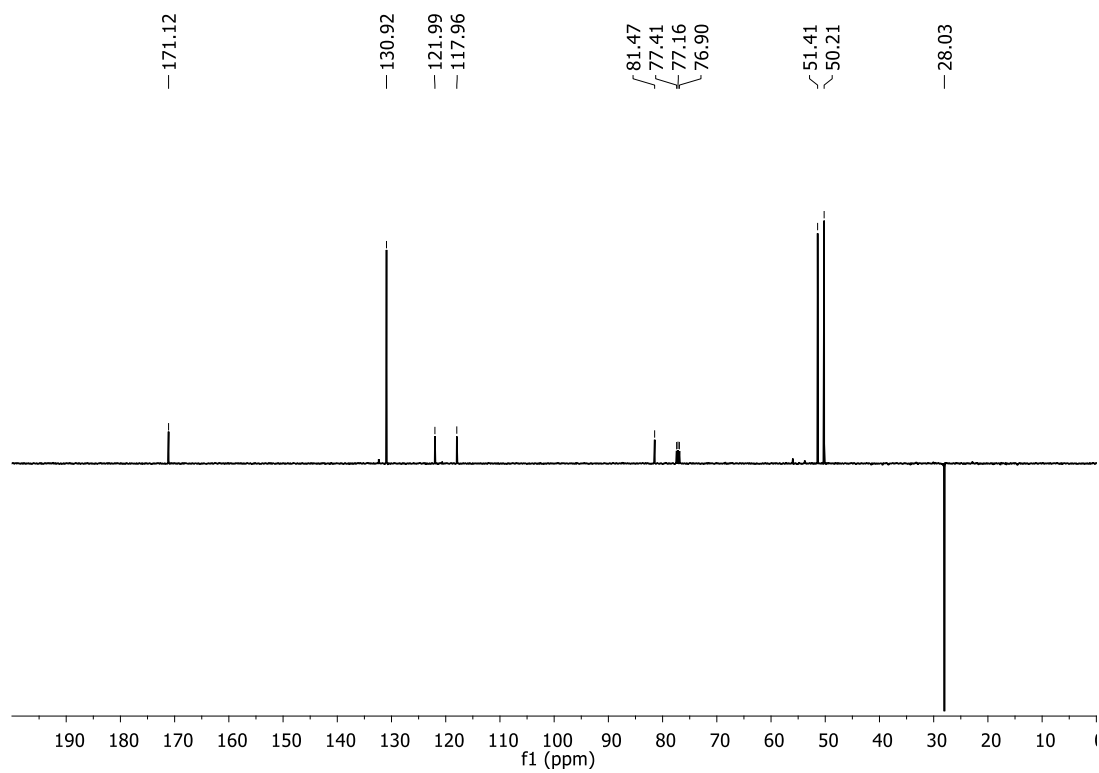
43: UPLC-MS: $t_R = 2.3 \text{ min}$ (3-40% B in 6 min); $m/z = 908.7$ ($(M+H)^+$, ber.: 908.5); Summenformel: $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{N}_{13}\text{O}_{13}$ (MW = $907.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

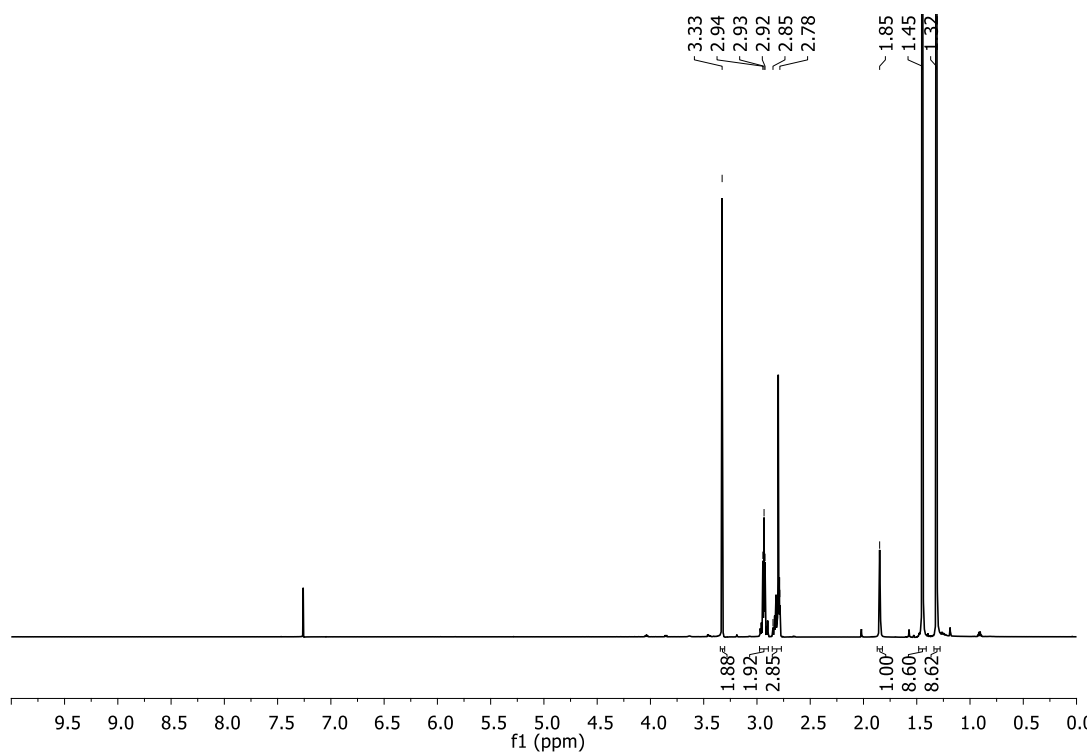
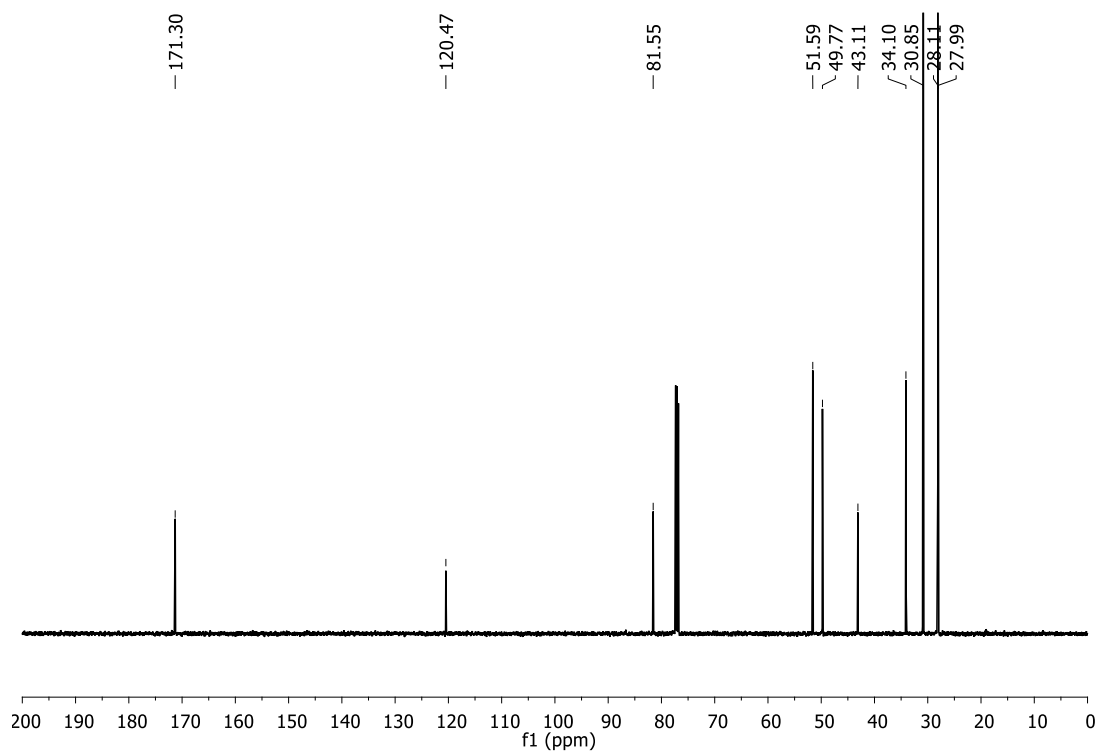
7. Anhang

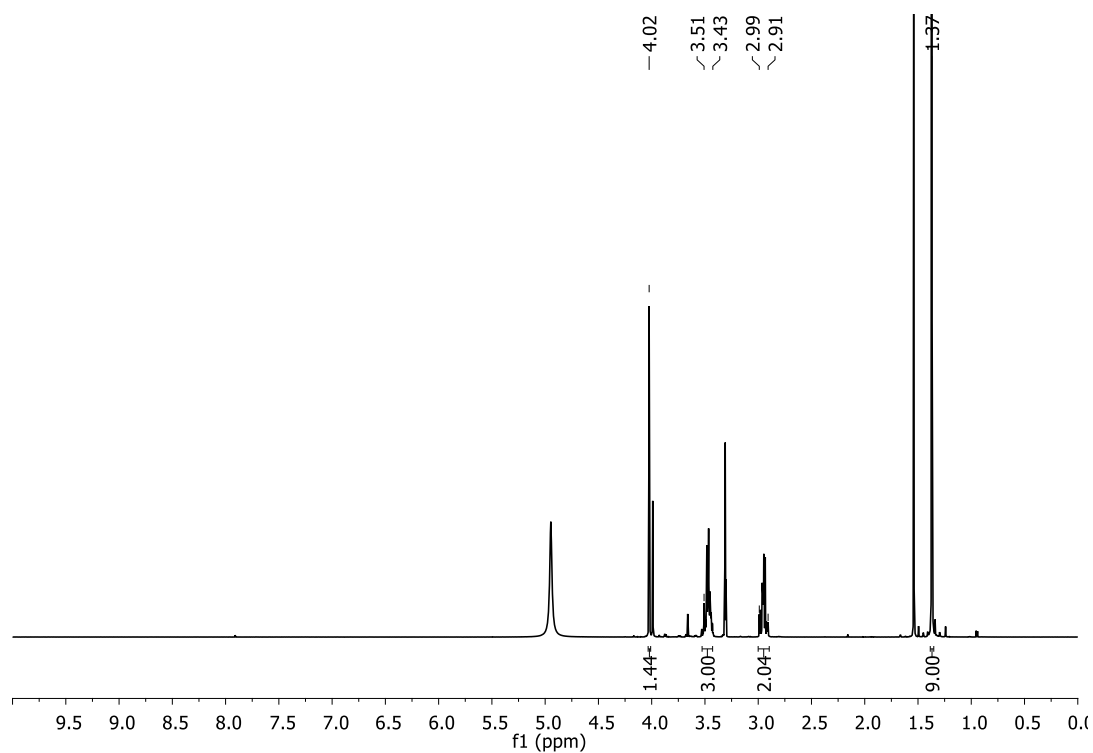
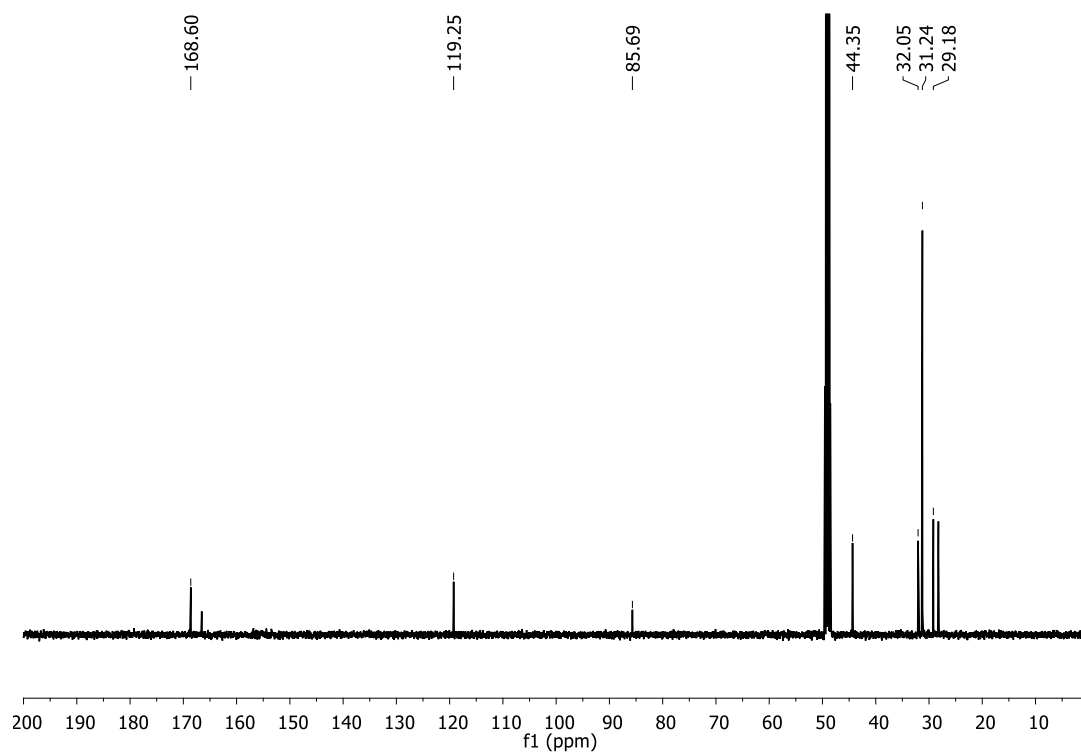
^1H -NMR: Amin **13b**

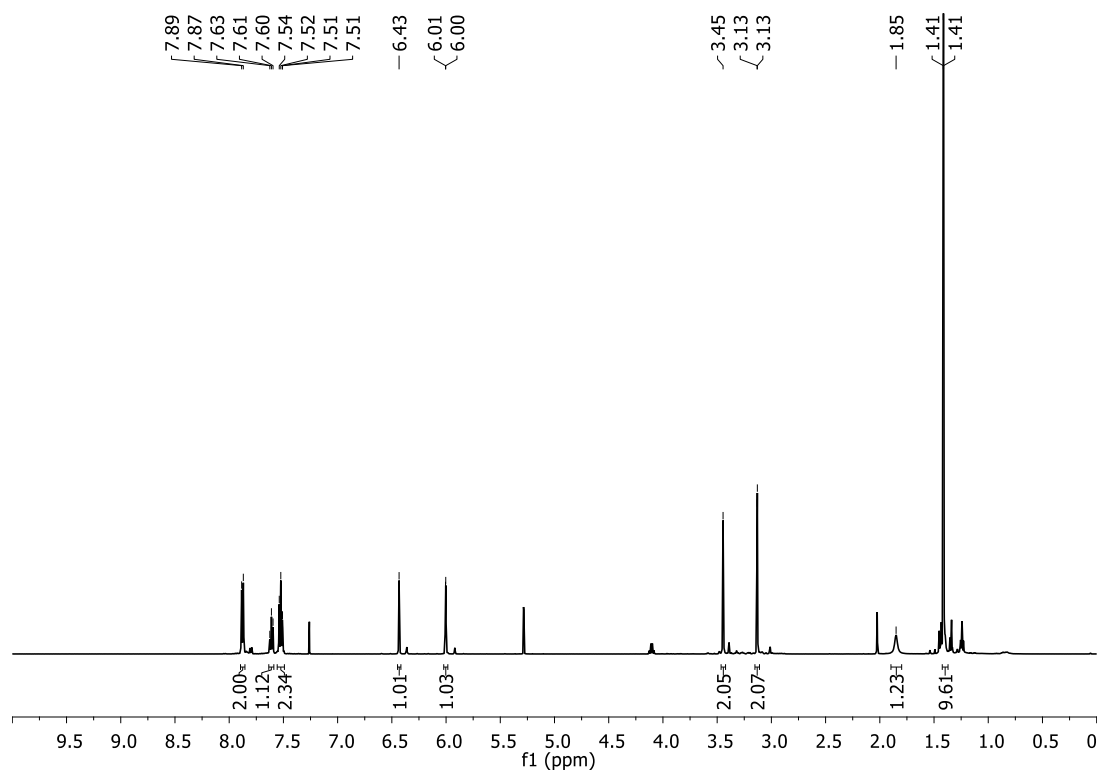
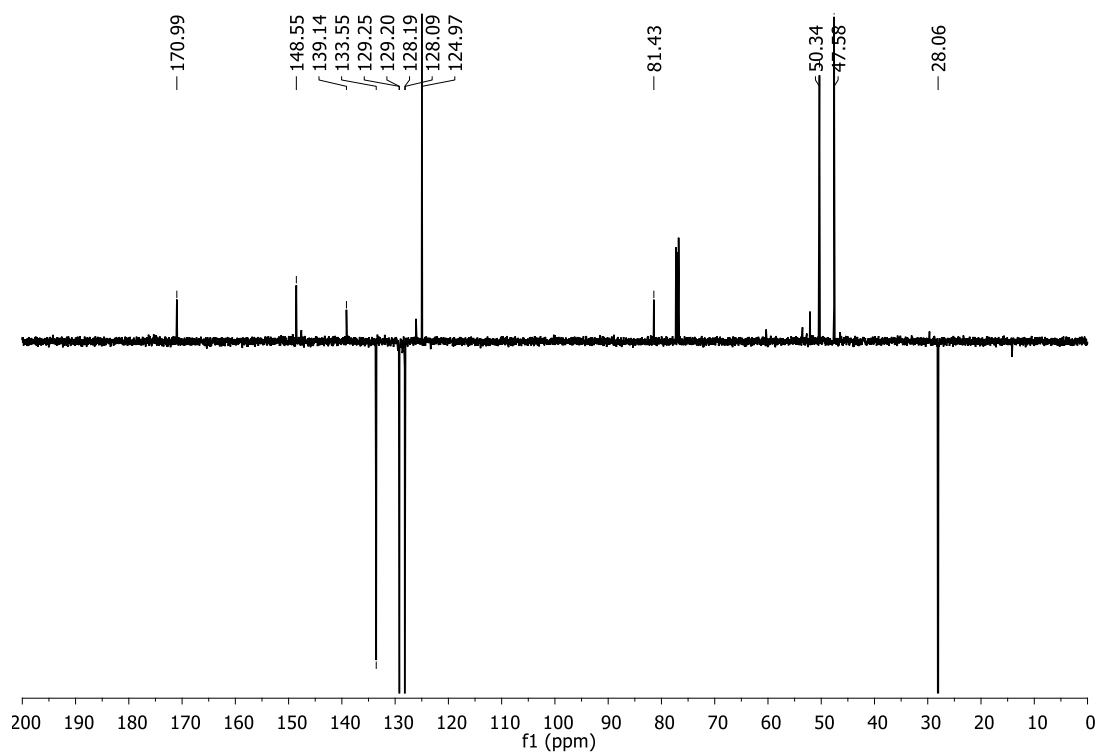


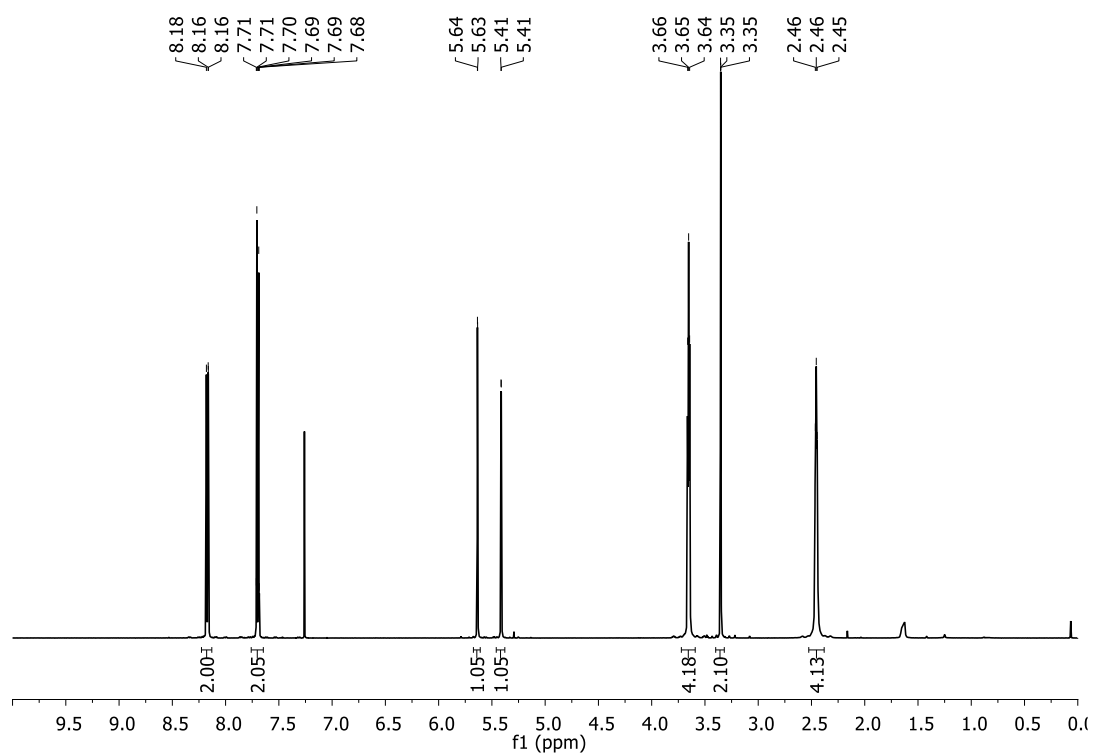
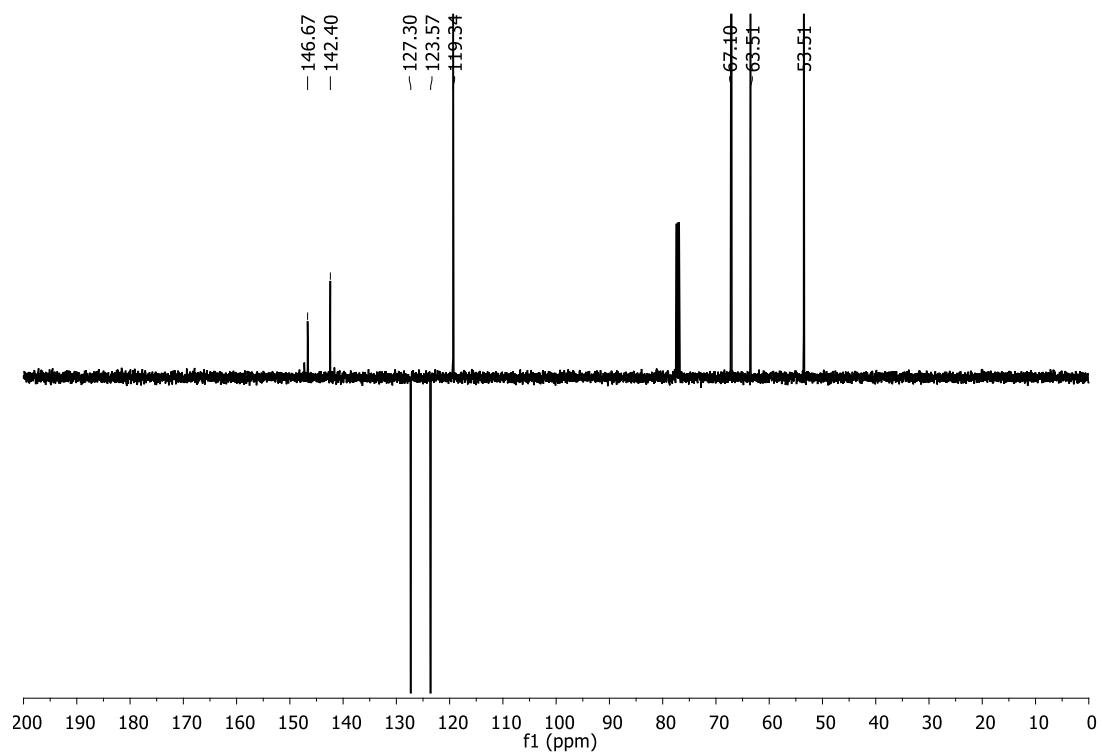
^{13}C -NMR: Amin **13b**

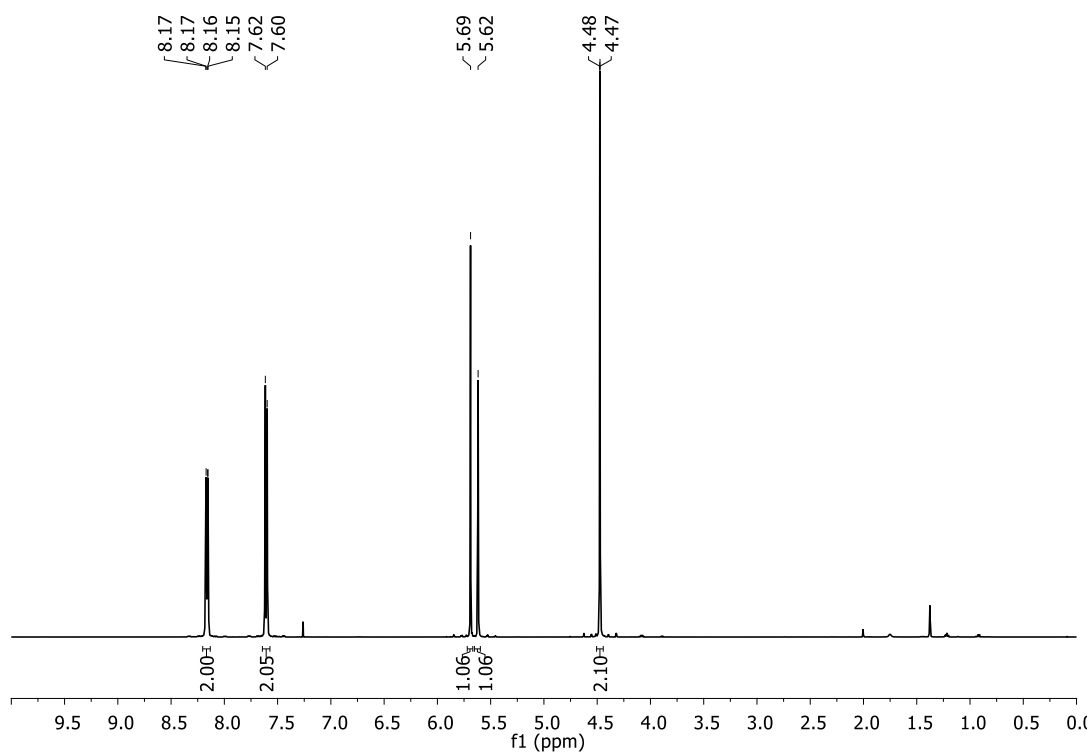
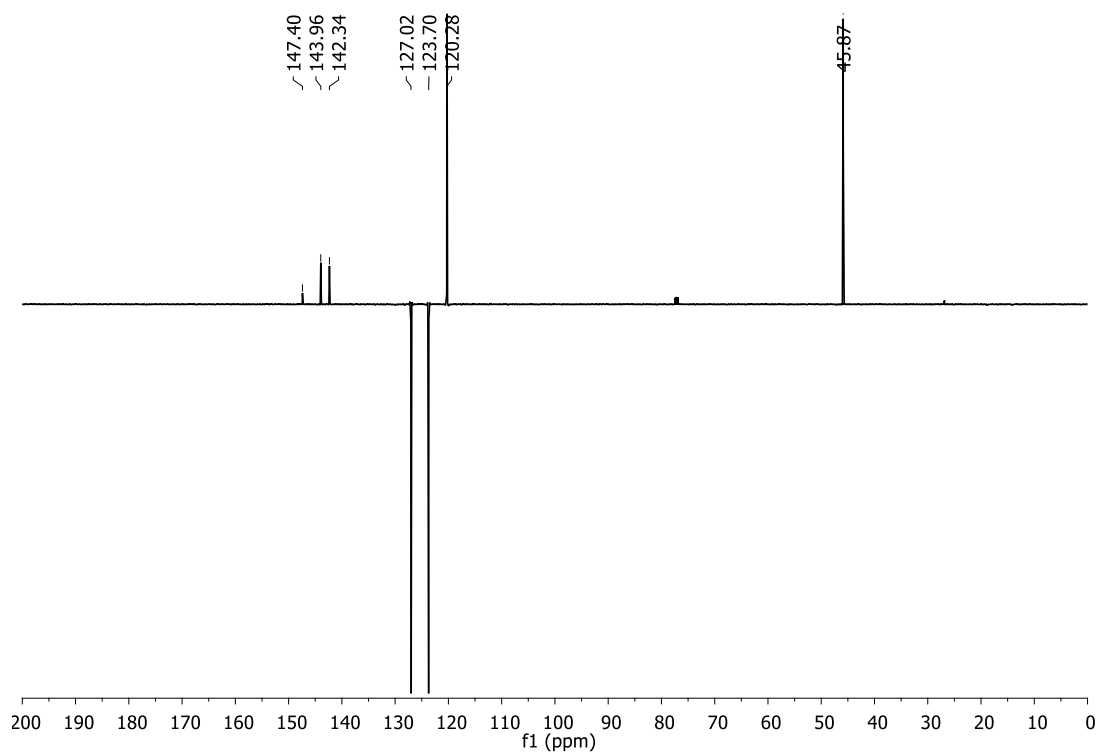


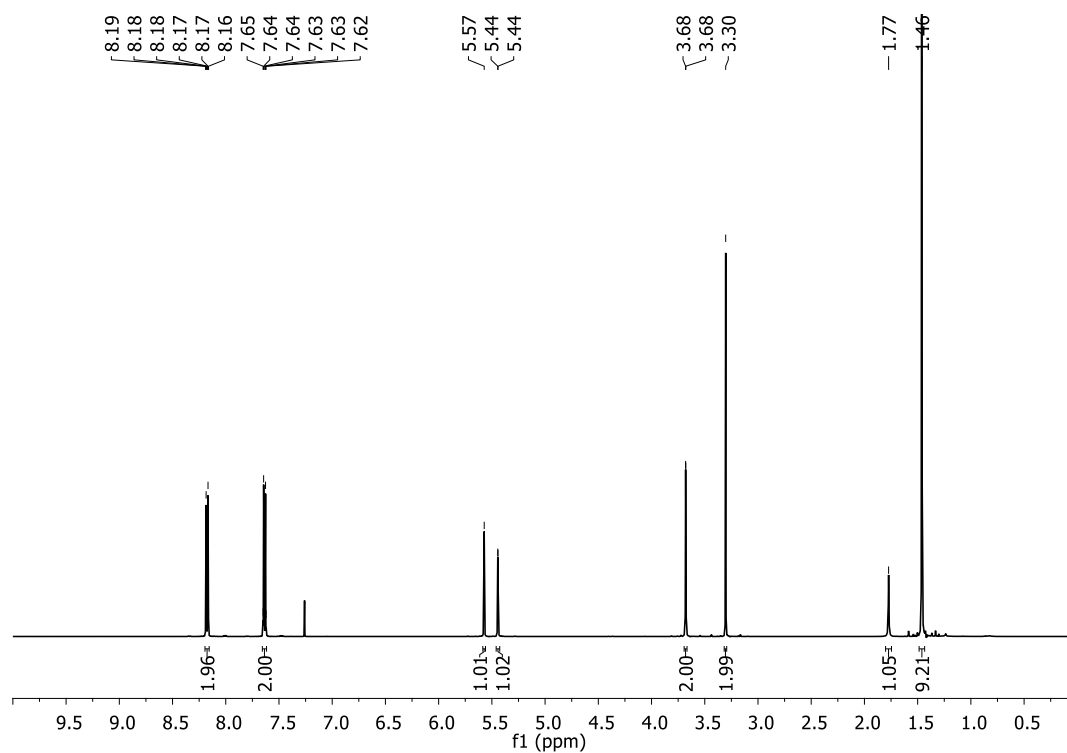
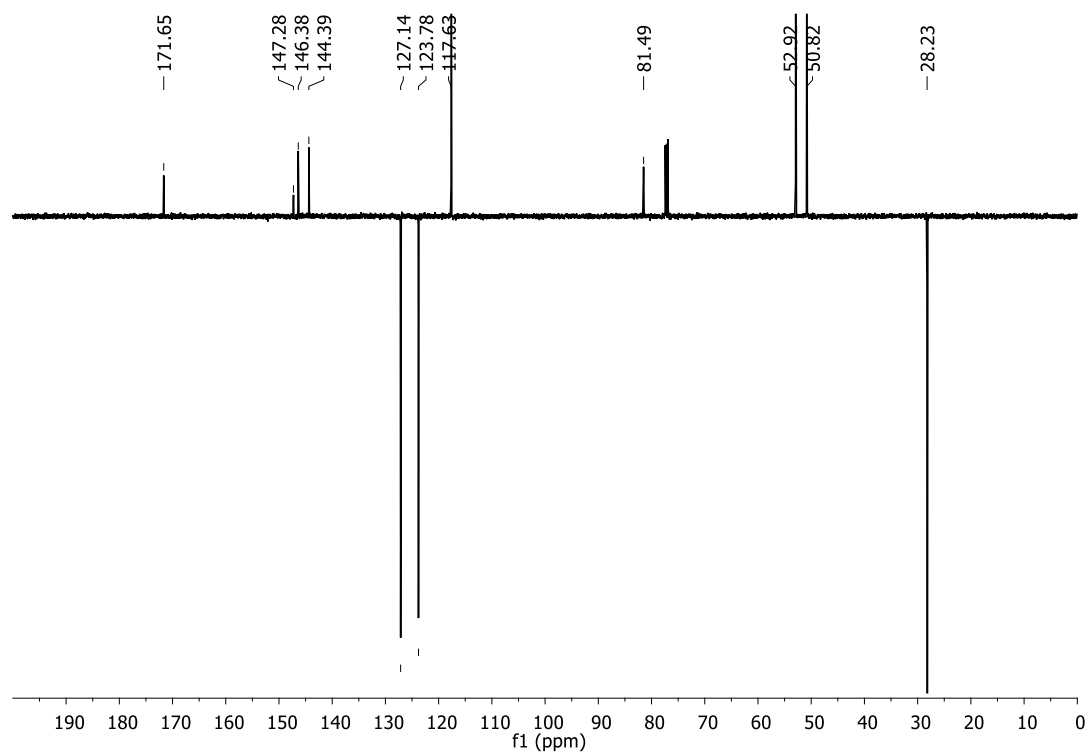
^1H -NMR: Thioether **14b** ^{13}C -NMR: Thioether **14b**

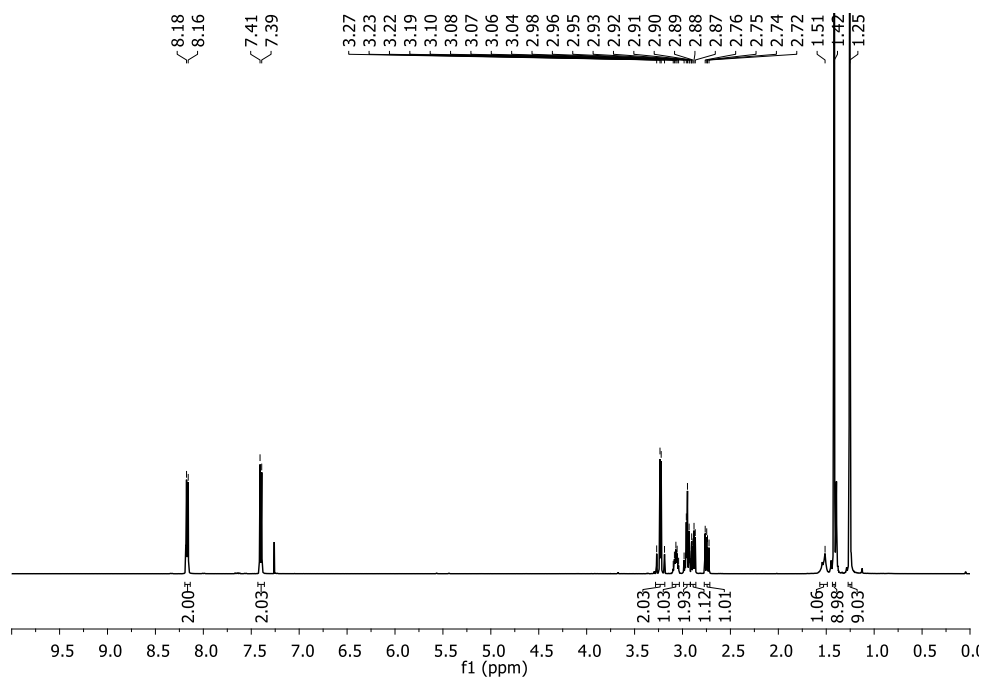
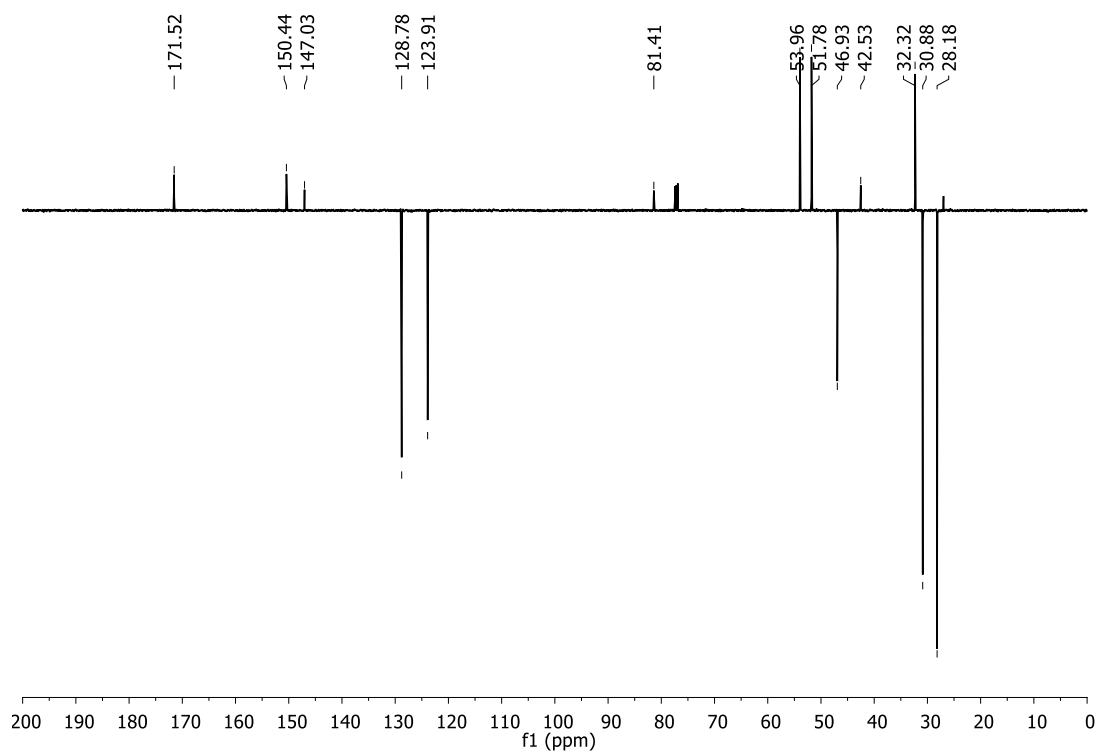
¹H-NMR: Auxiliar-Glycinkonjugat **15b**¹³C-NMR: Auxiliar-Glycinkonjugat **15b**

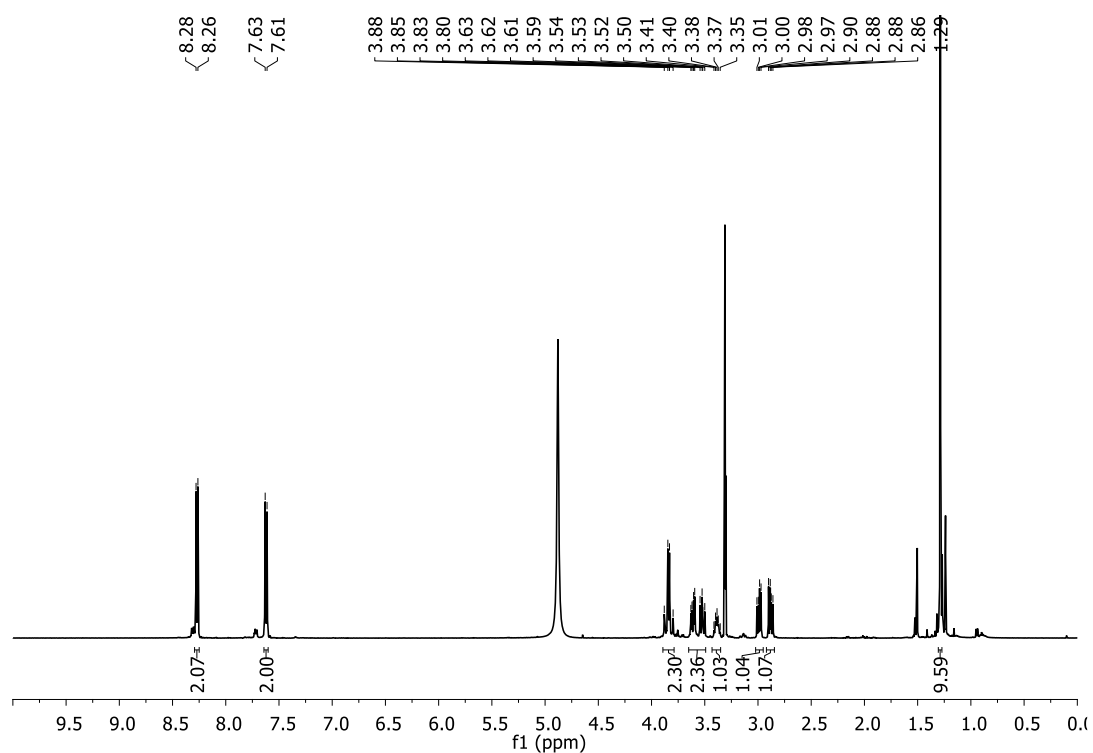
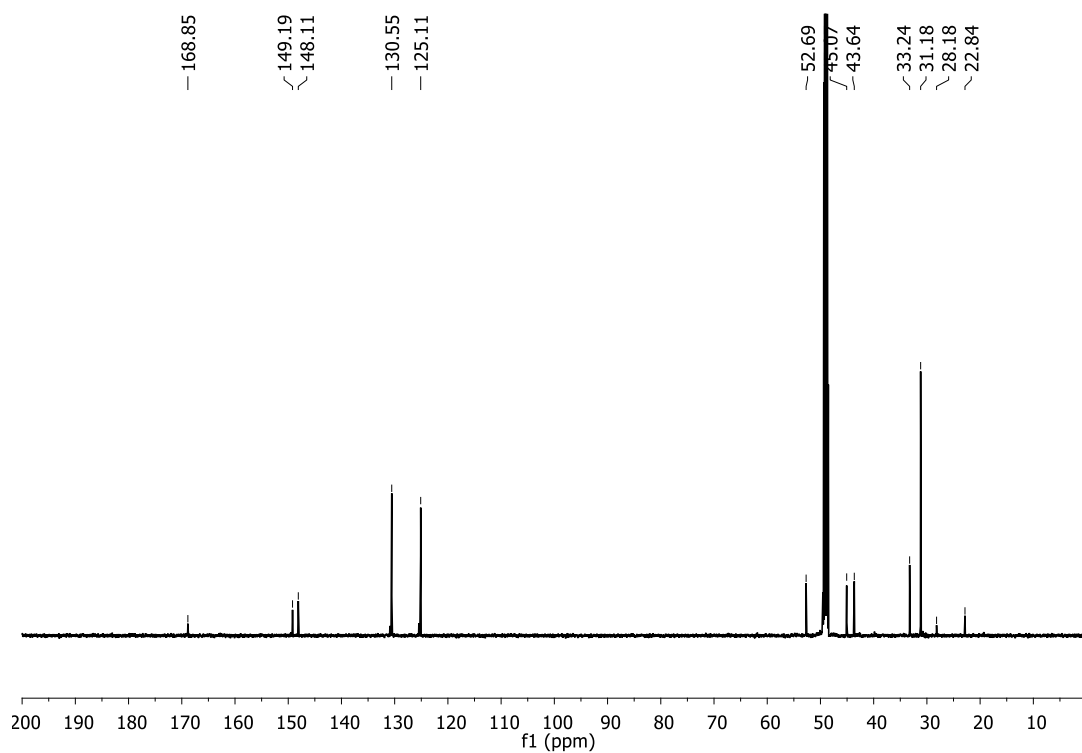
¹H-NMR: Amin **13a**¹³C-NMR: Amin **13a**

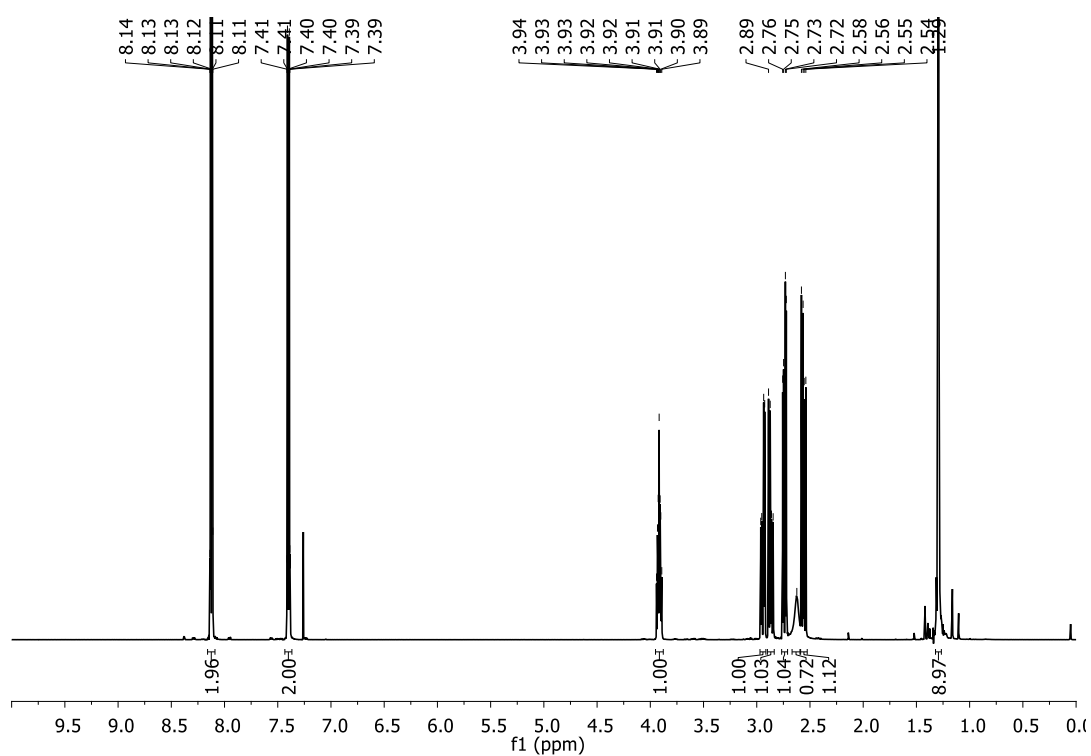
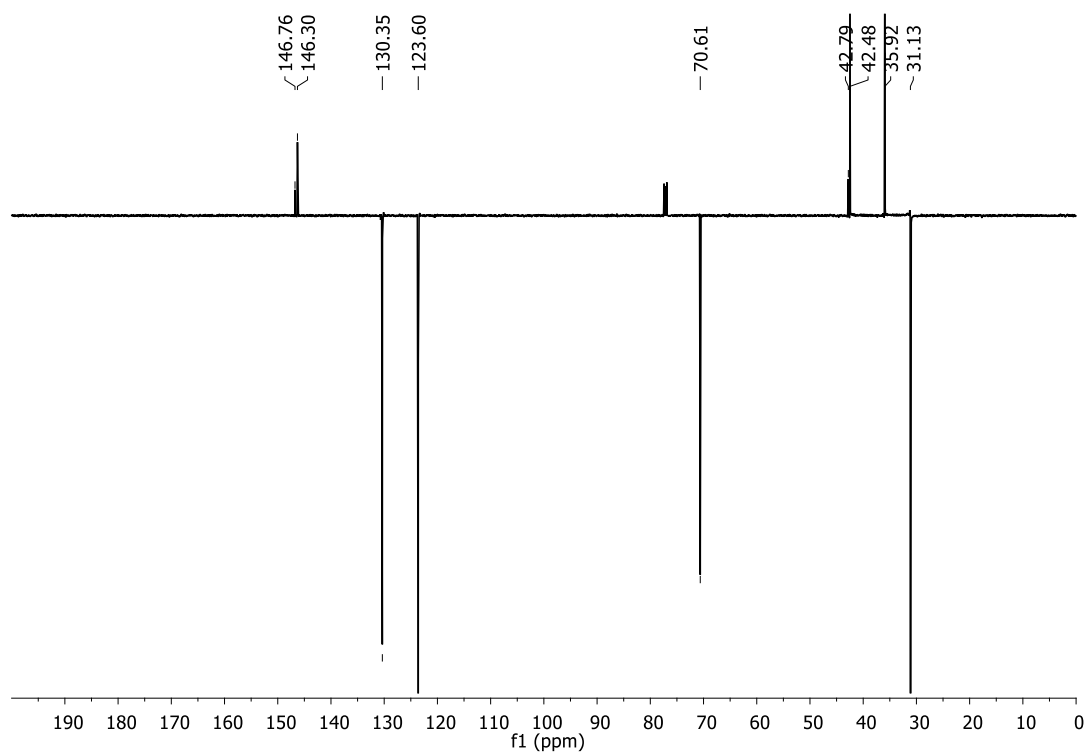
^1H -NMR: Amin 17c ^{13}C -NMR: Amin 17c

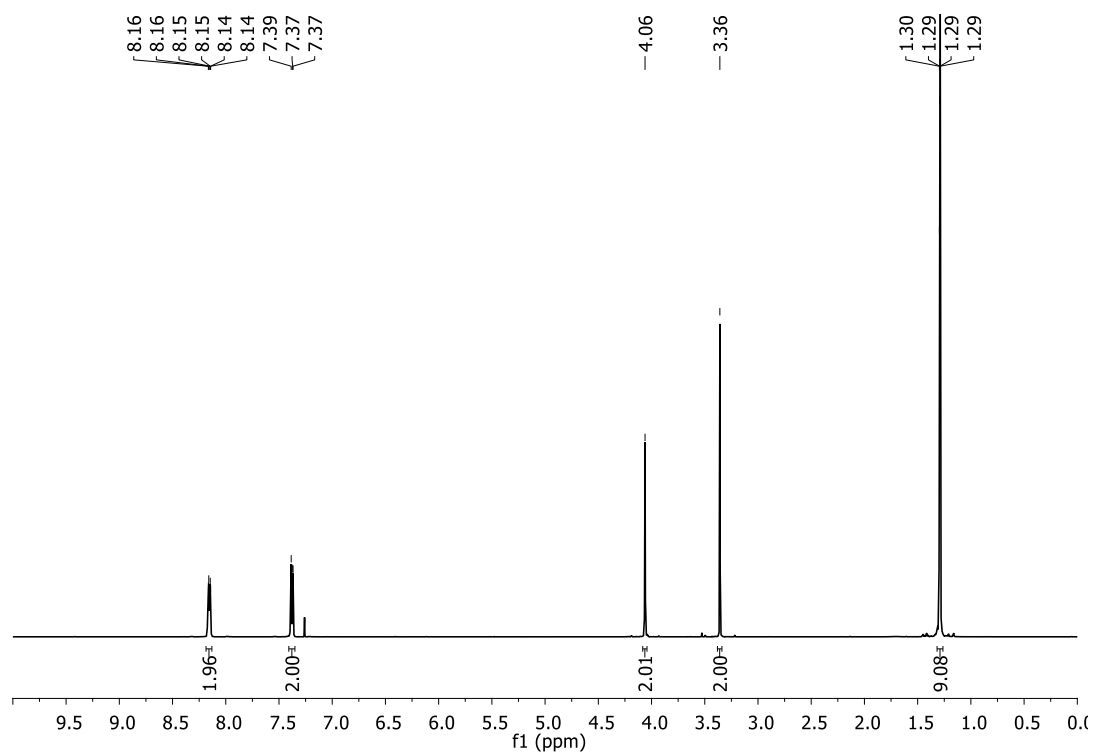
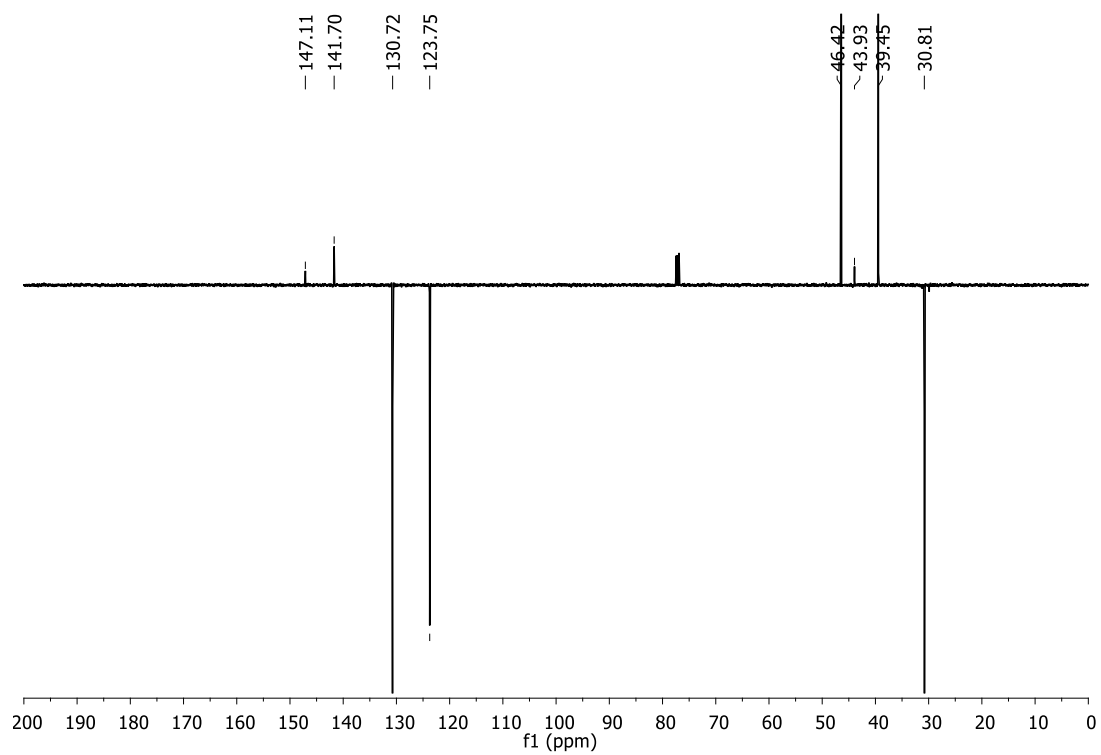
^1H -NMR: Alkylchlorid **12c** ^{13}C -NMR: Alkylchlorid **12c**

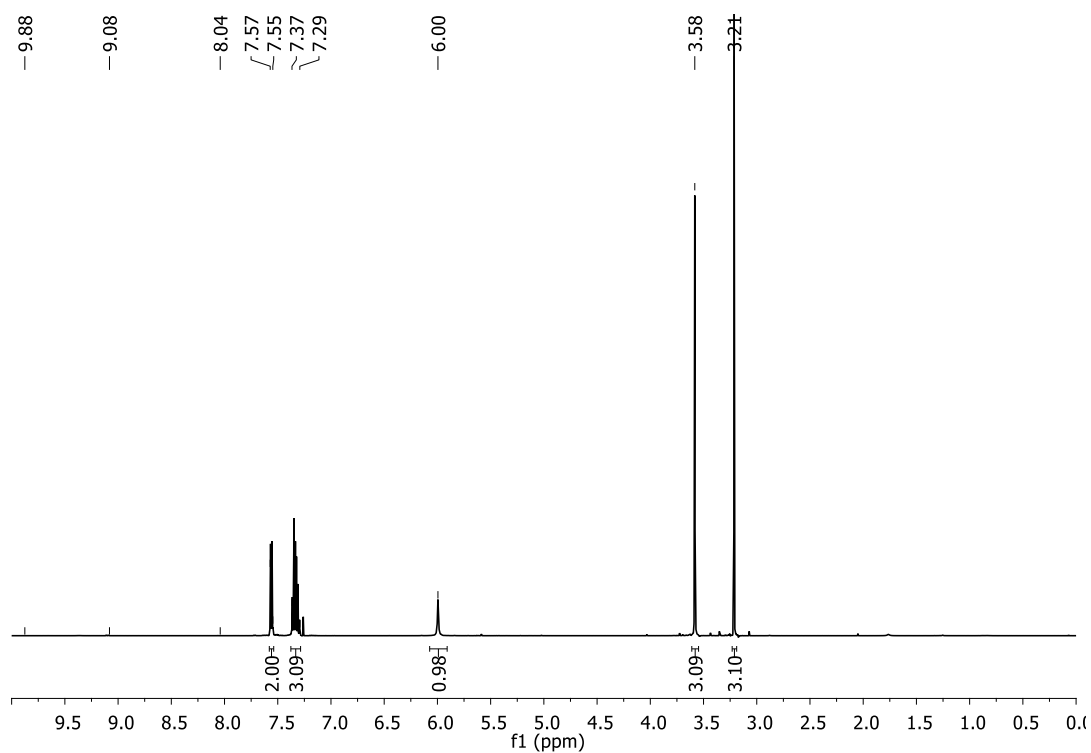
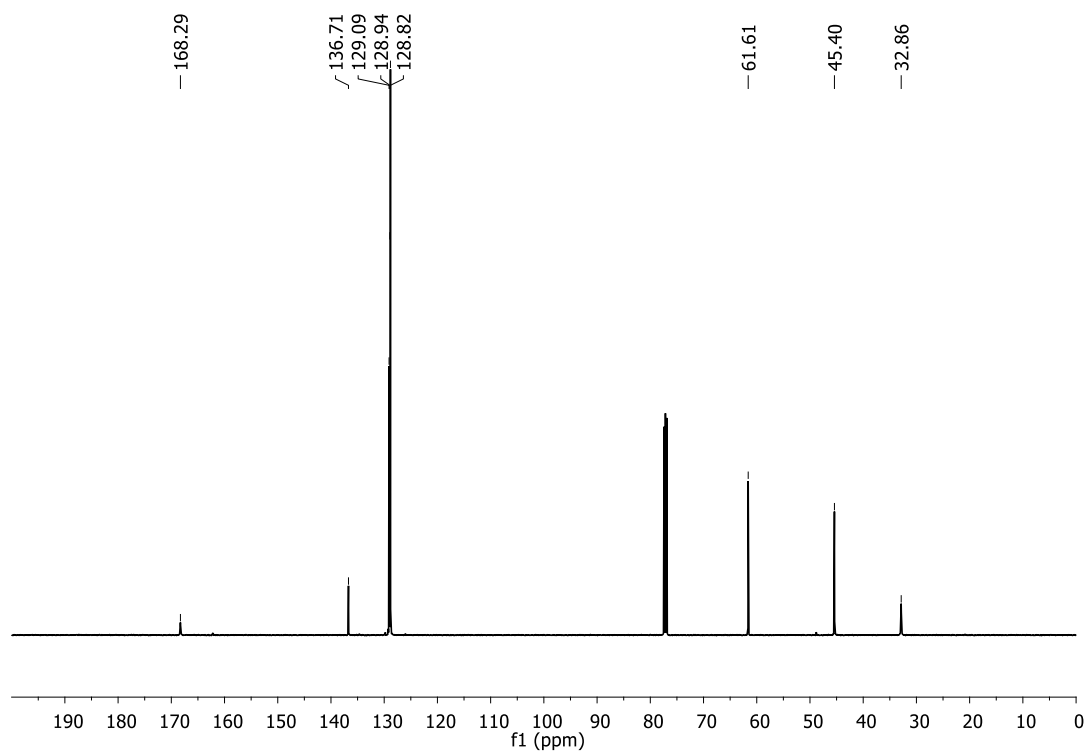
^1H -NMR: Amin **13c** ^{13}C -NMR: Amin **13c**

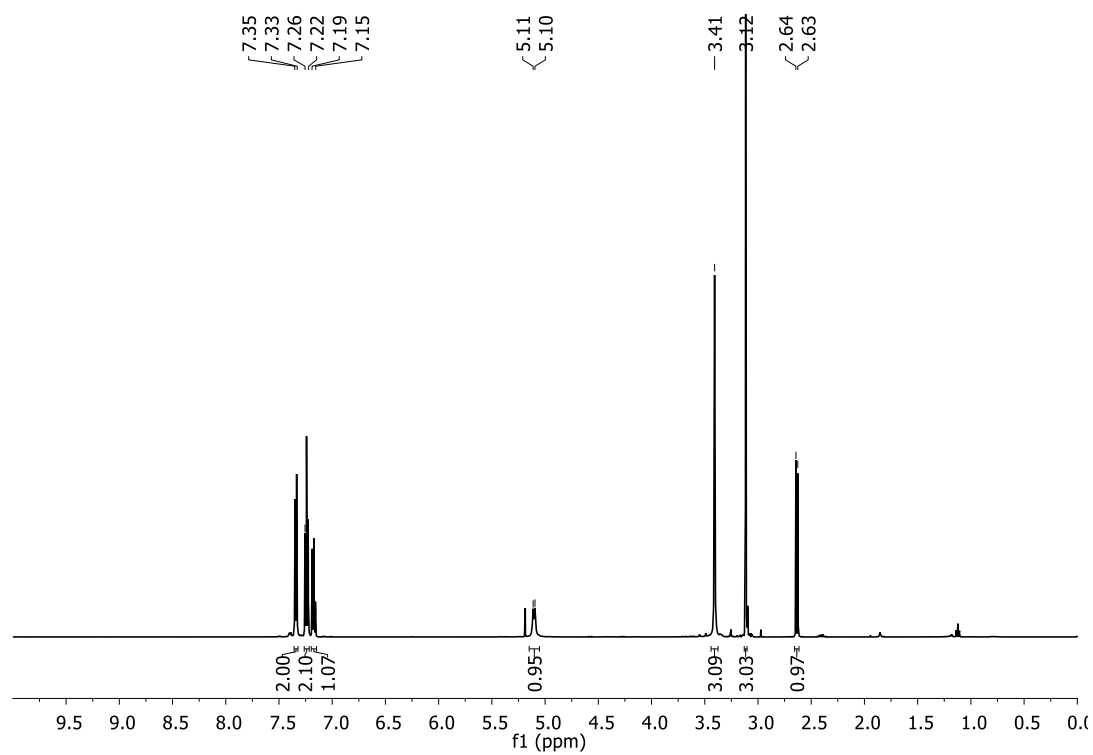
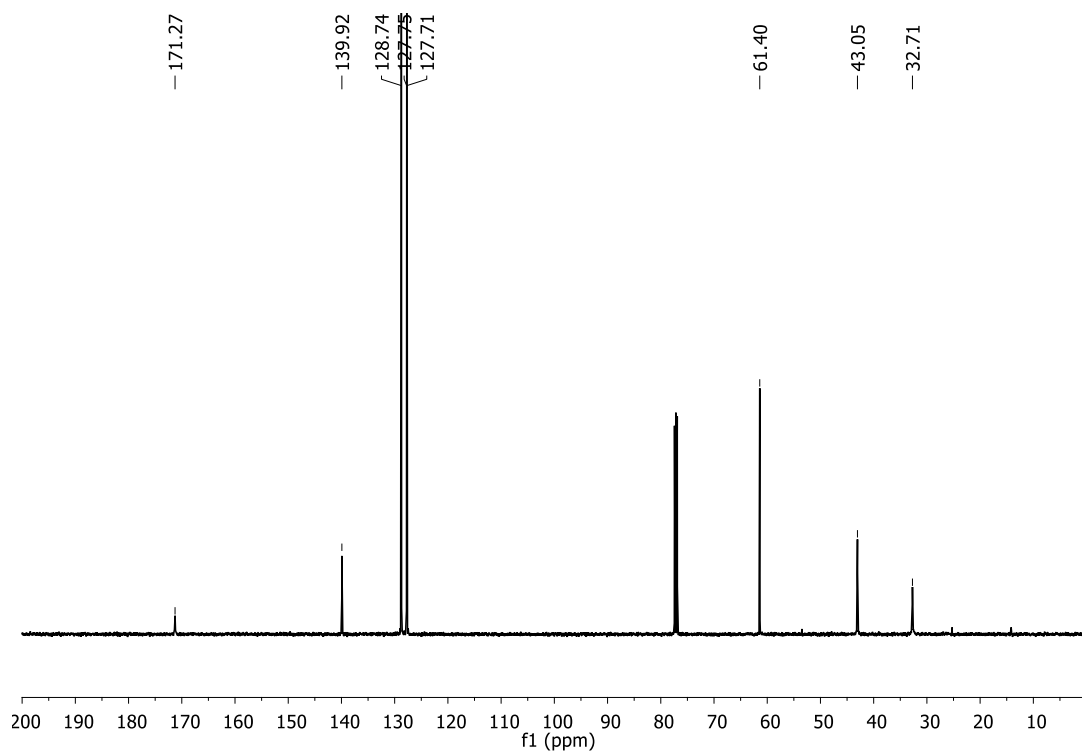
^1H -NMR: Thioether **14c** ^{13}C -NMR: Thioether **14c**

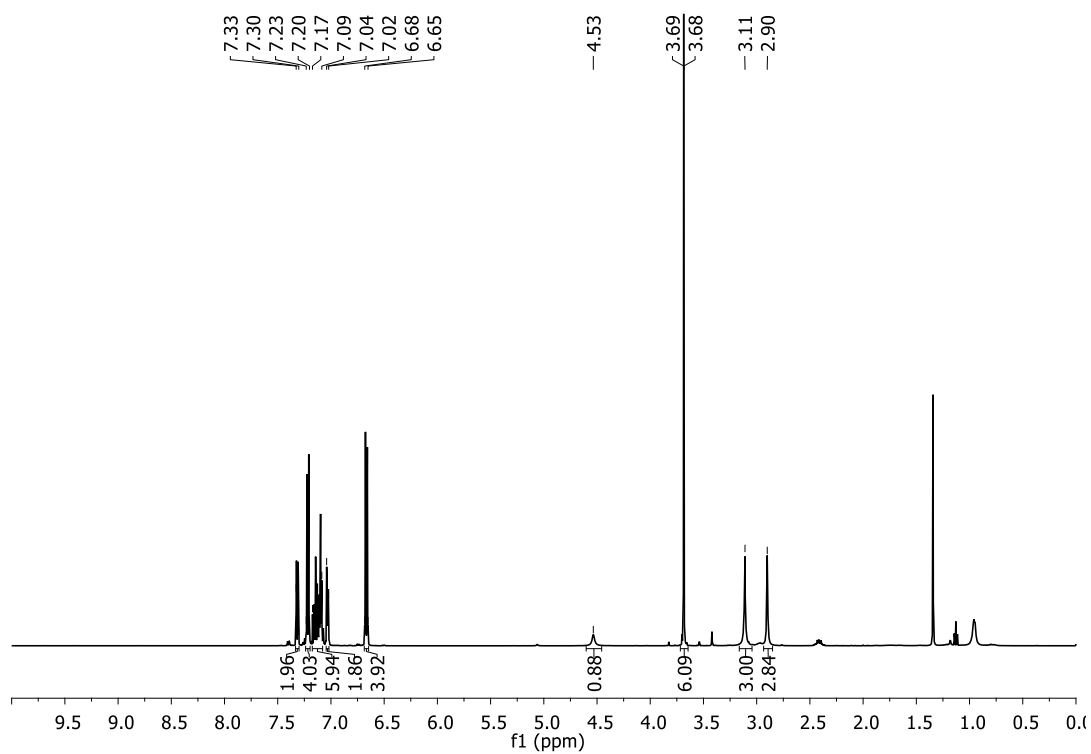
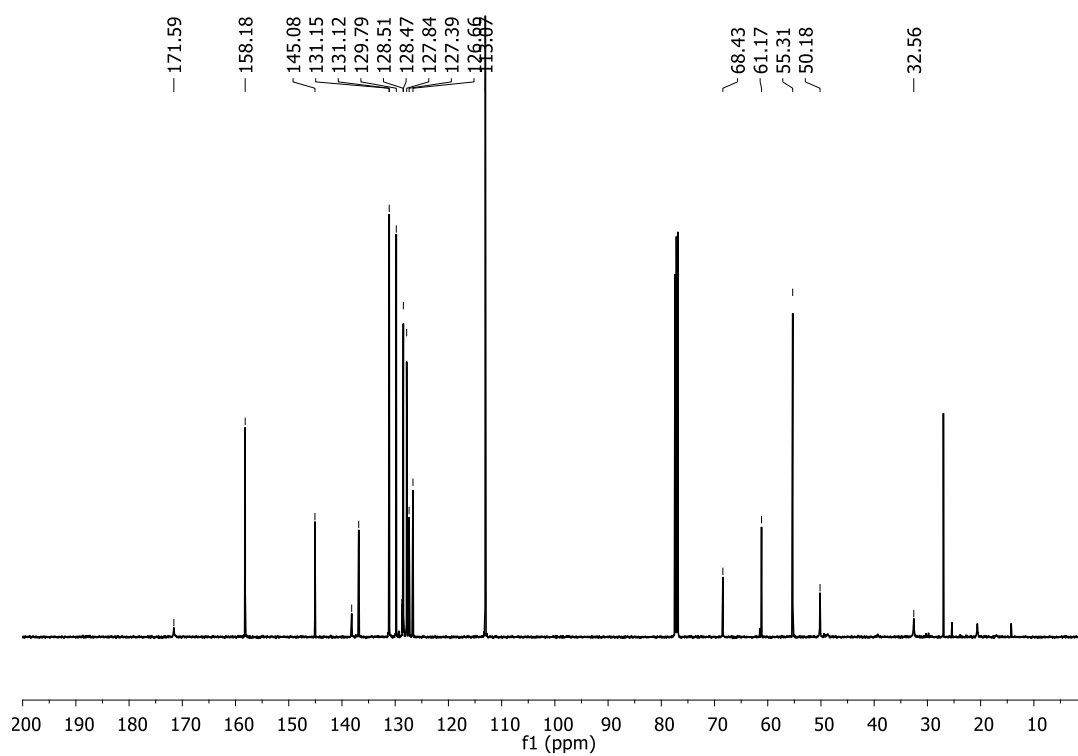
¹H-NMR: Auxiliar-Glycinkonjugat **15c**¹³C-NMR: Auxiliar-Glycinkonjugat **15c**

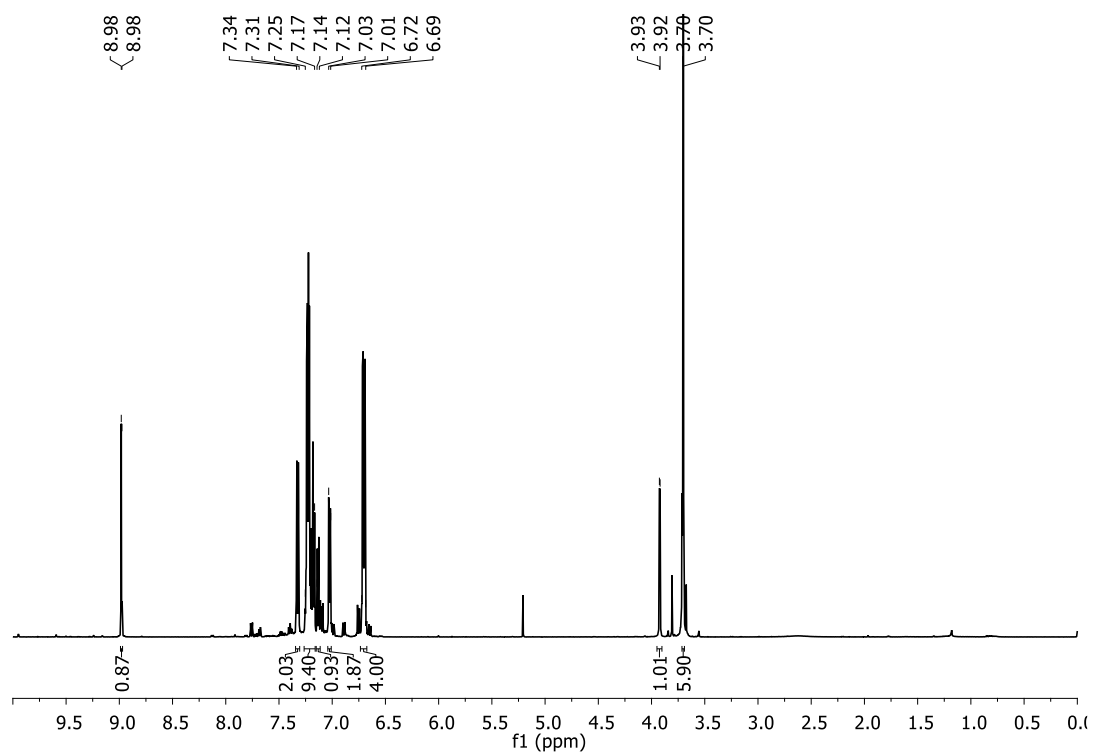
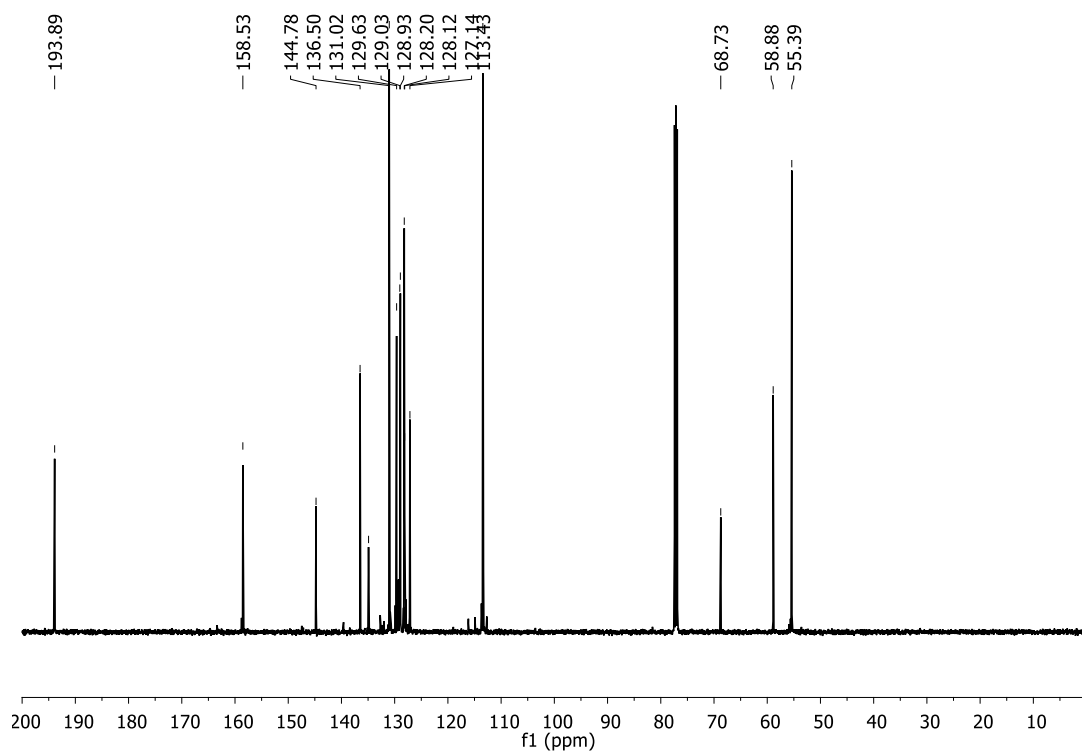
^1H -NMR: Alkohol 56 ^{13}C -NMR: Alkohol 56

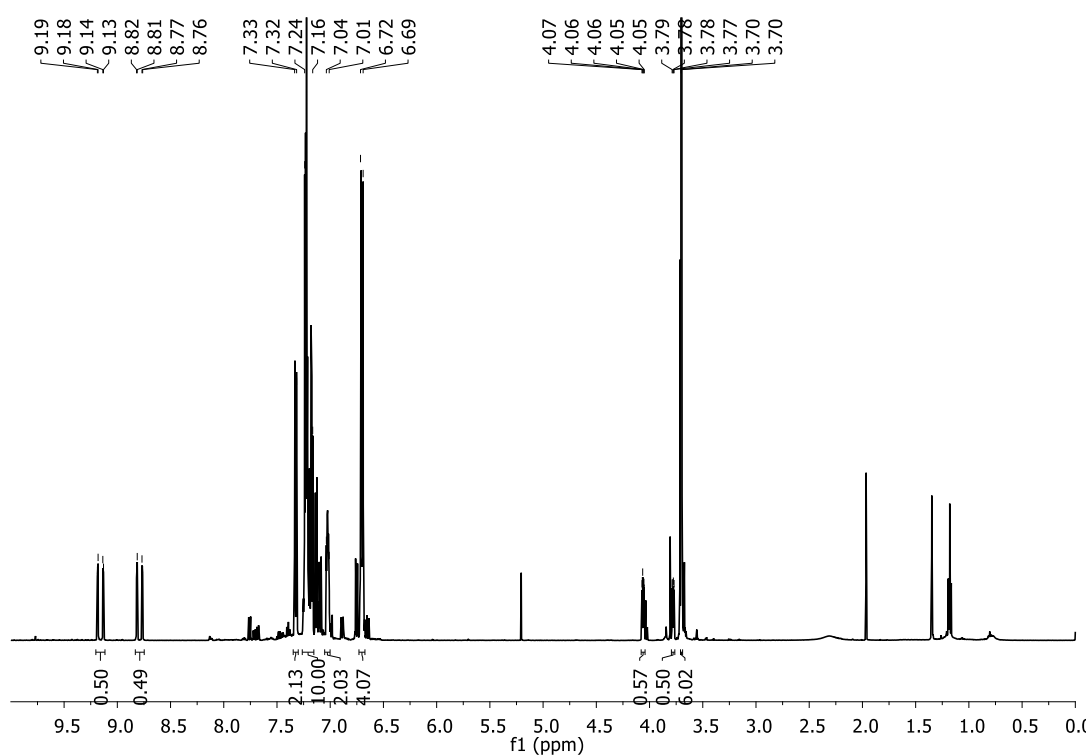
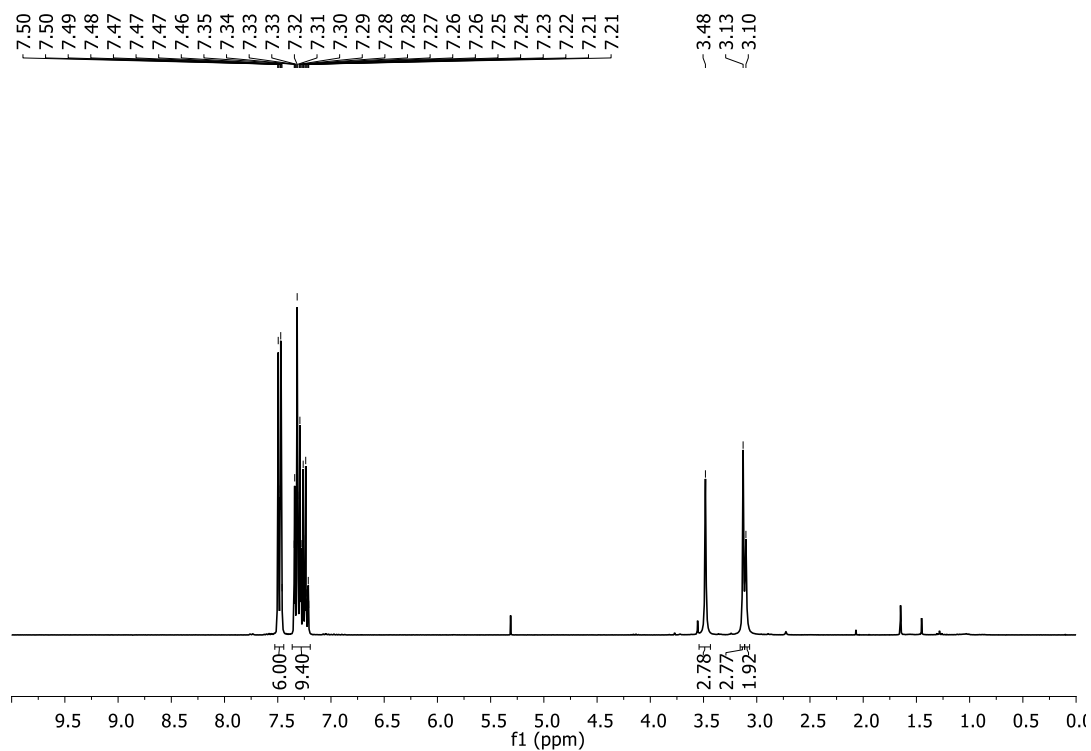
^1H -NMR: Keton 57 ^{13}C -NMR: Keton 57

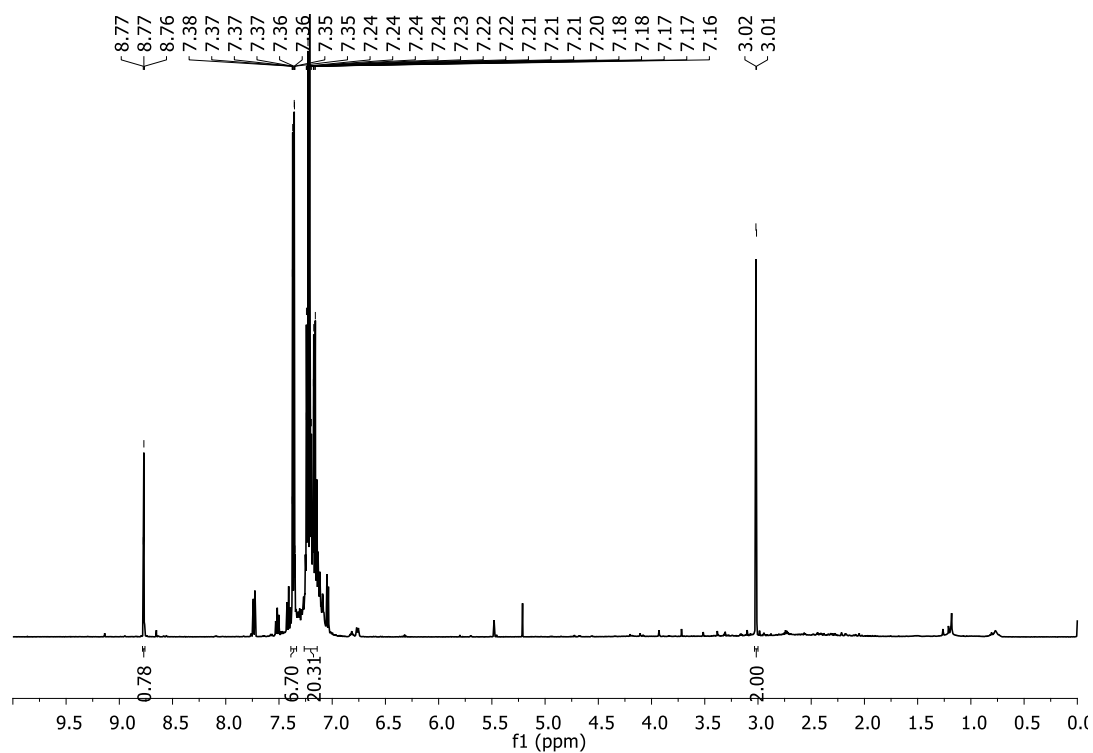
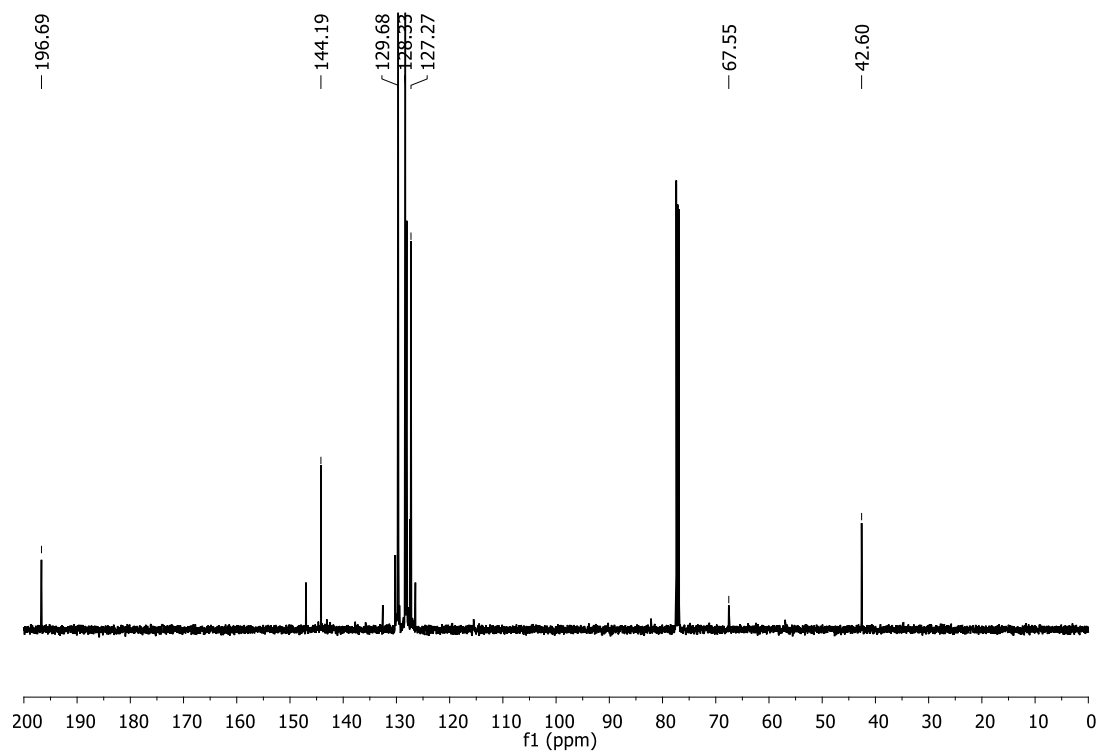
¹H-NMR: Weinrebamid **81**¹³C-NMR: Weinrebamid **81**

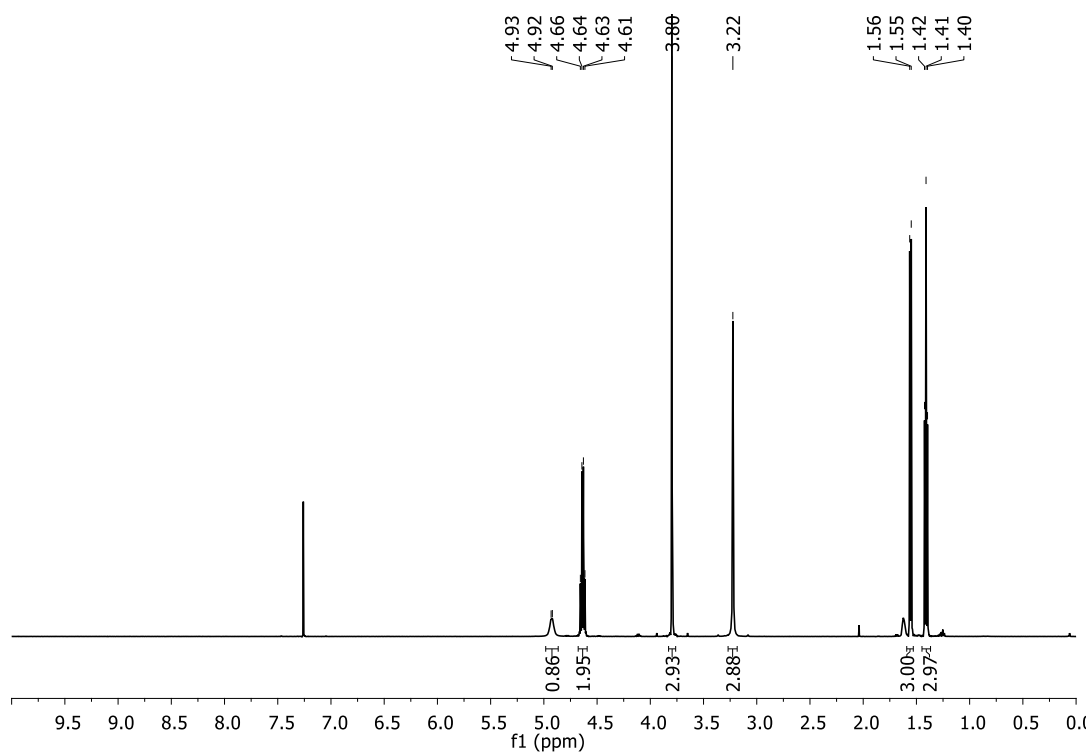
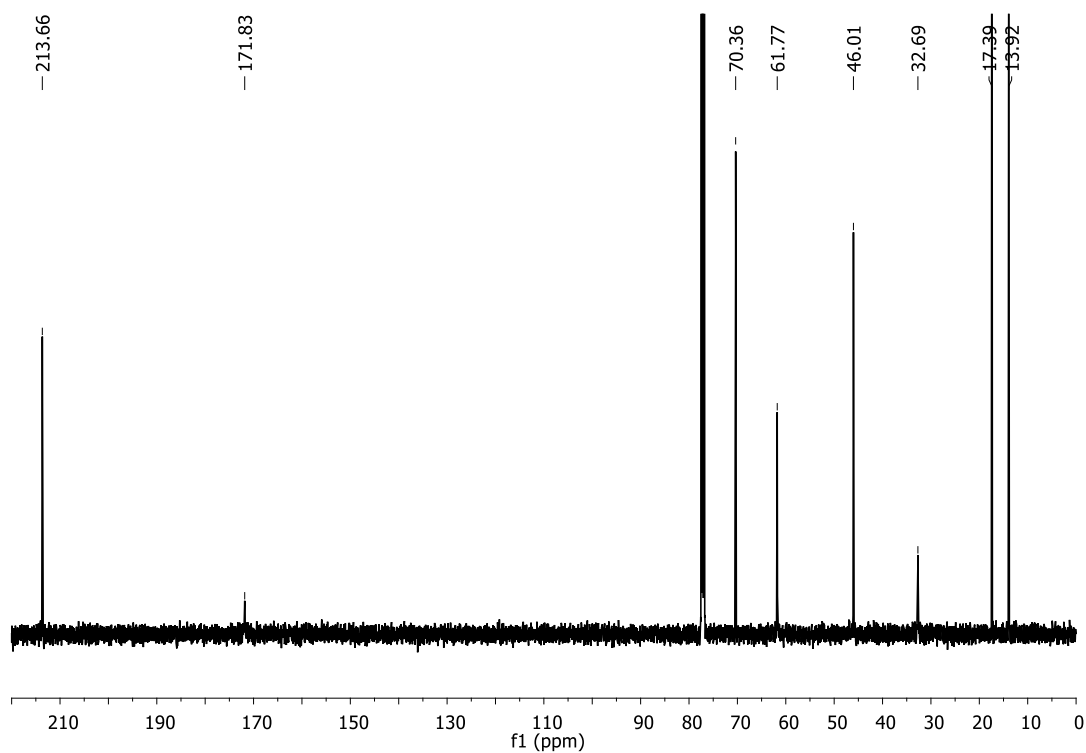
^1H -NMR: Thiol **82** ^{13}C -NMR: Thiol **82** ^1H -NMR: Thioether **S1**

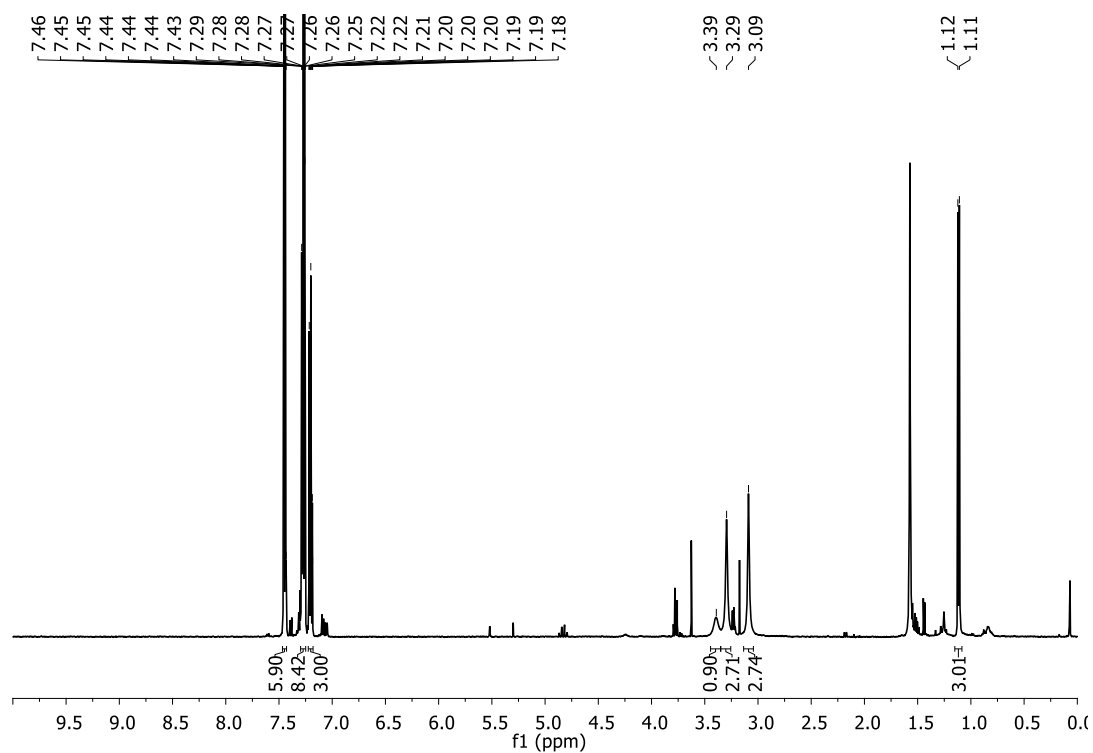
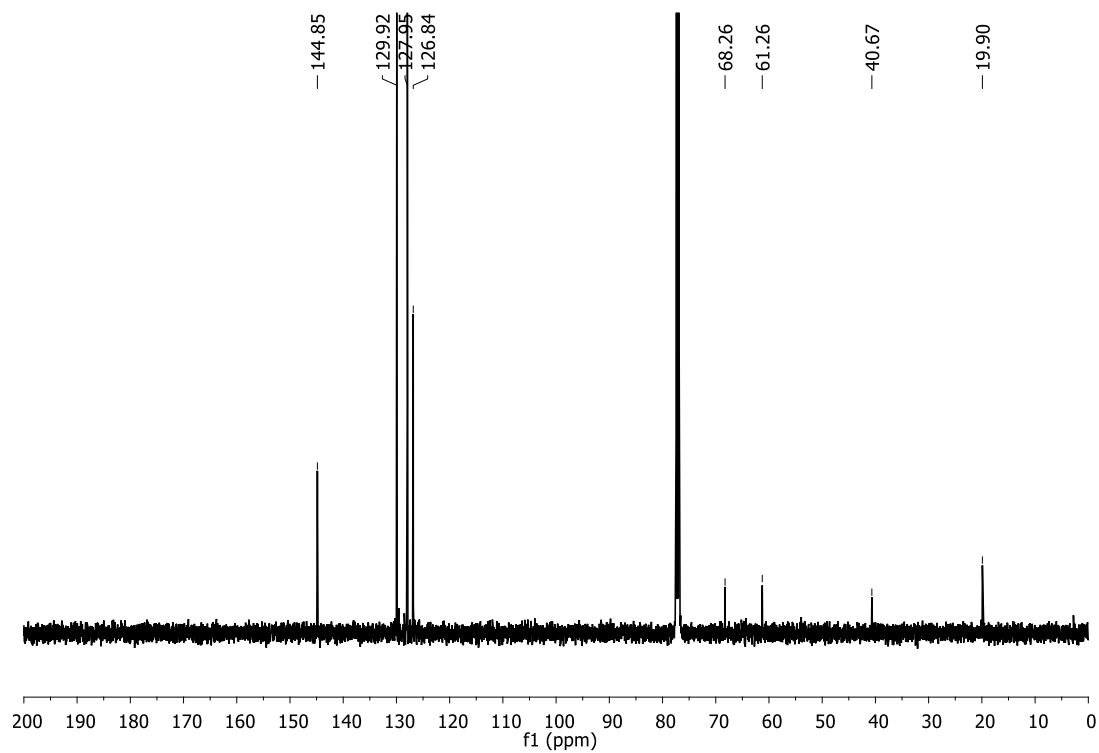
 ^{13}C -NMR: Thioether S1 ^1H -NMR: Aldehyd 83

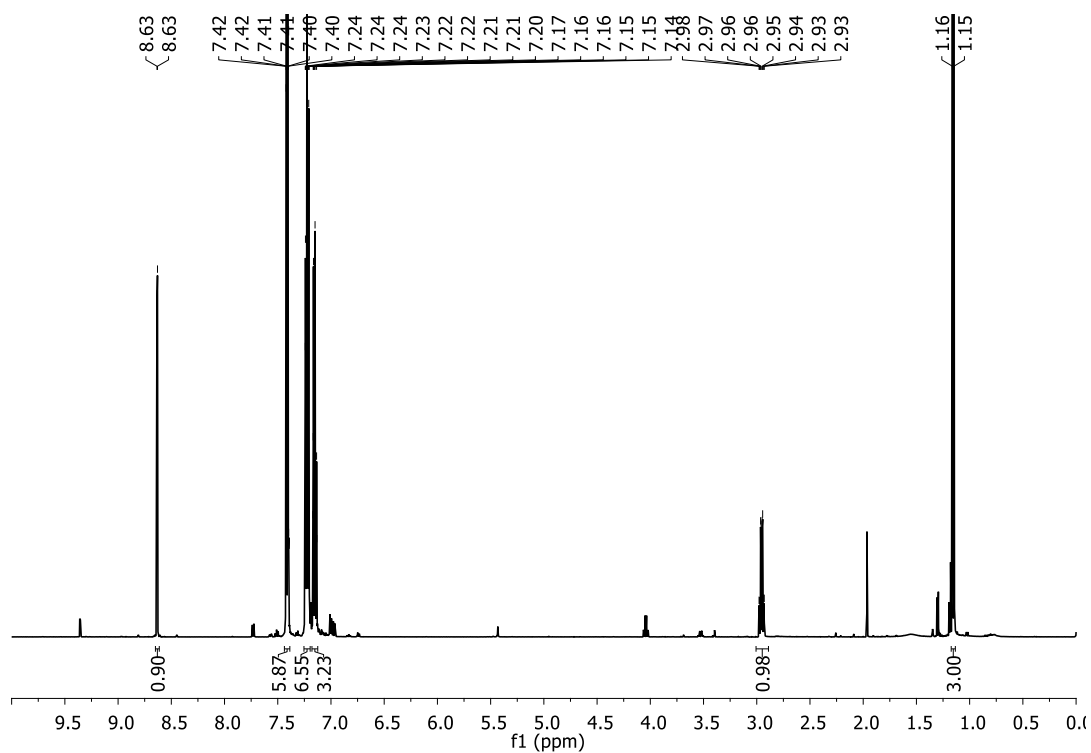
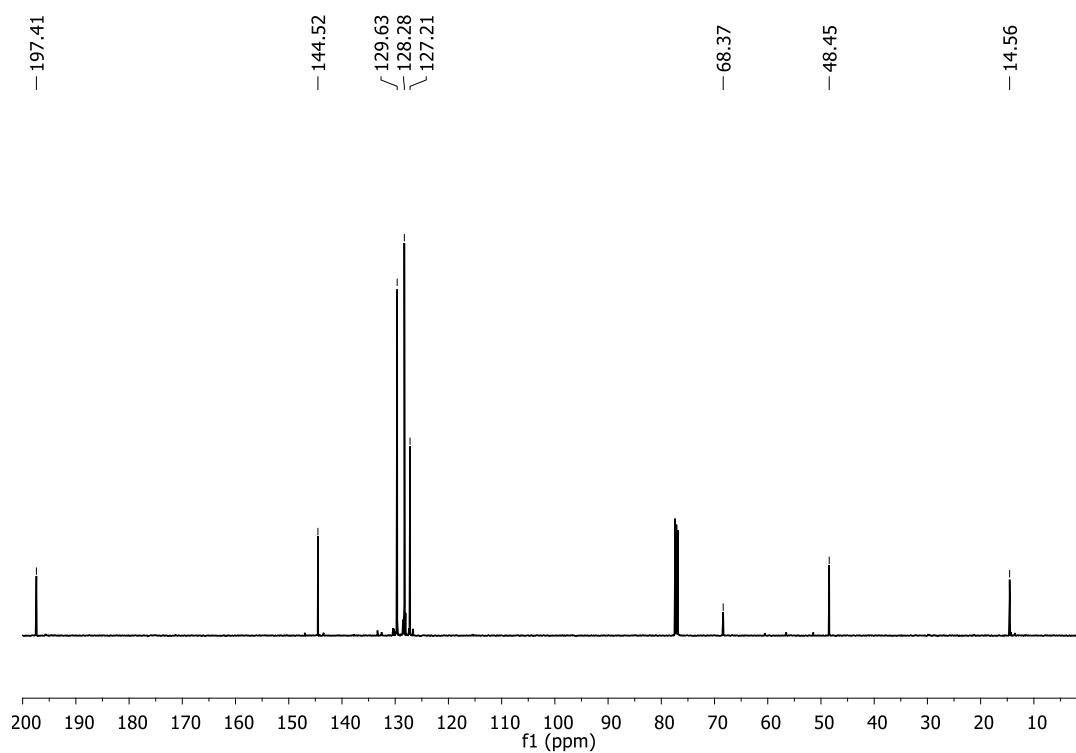
¹³C-NMR: Aldehyd 83

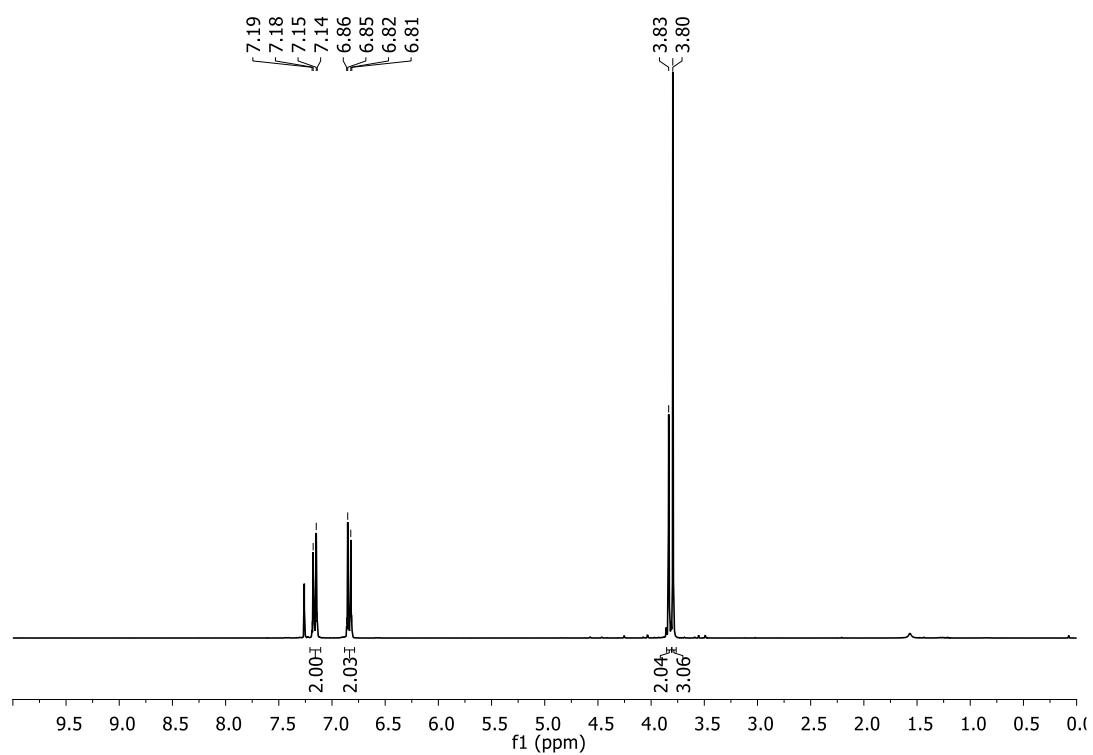
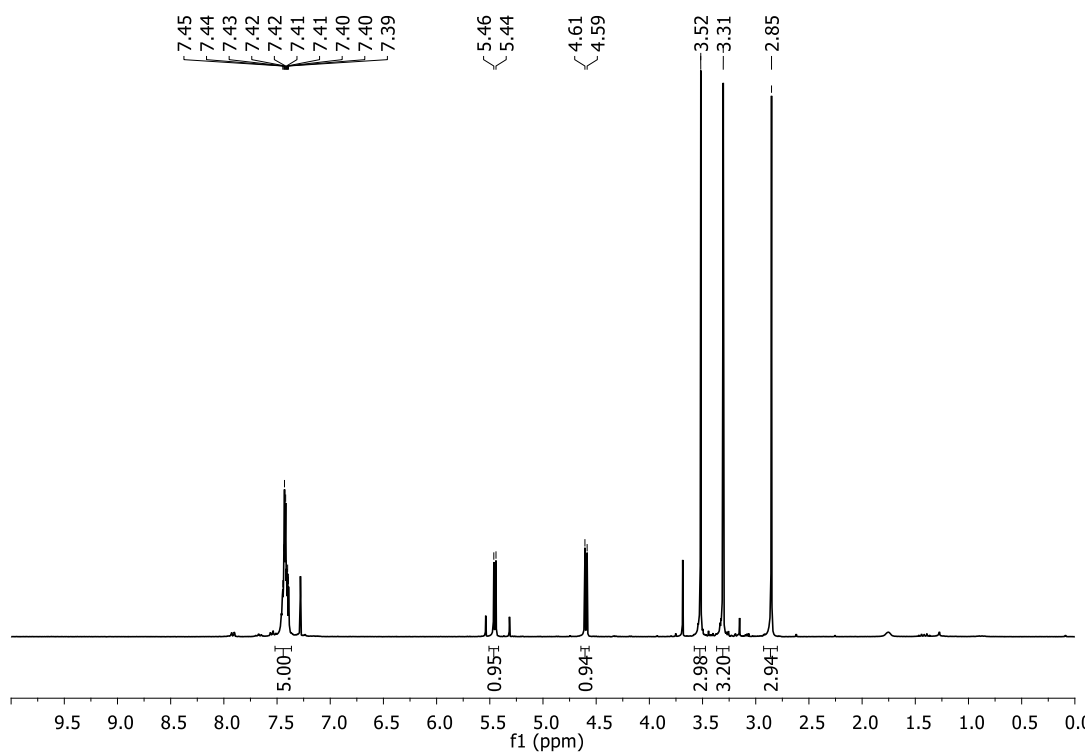
^1H -NMR: ^{13}C -markierter Aldehyd **128** ^1H -NMR: 2-(S-Trt)-Thioacetweinrebamid **138**

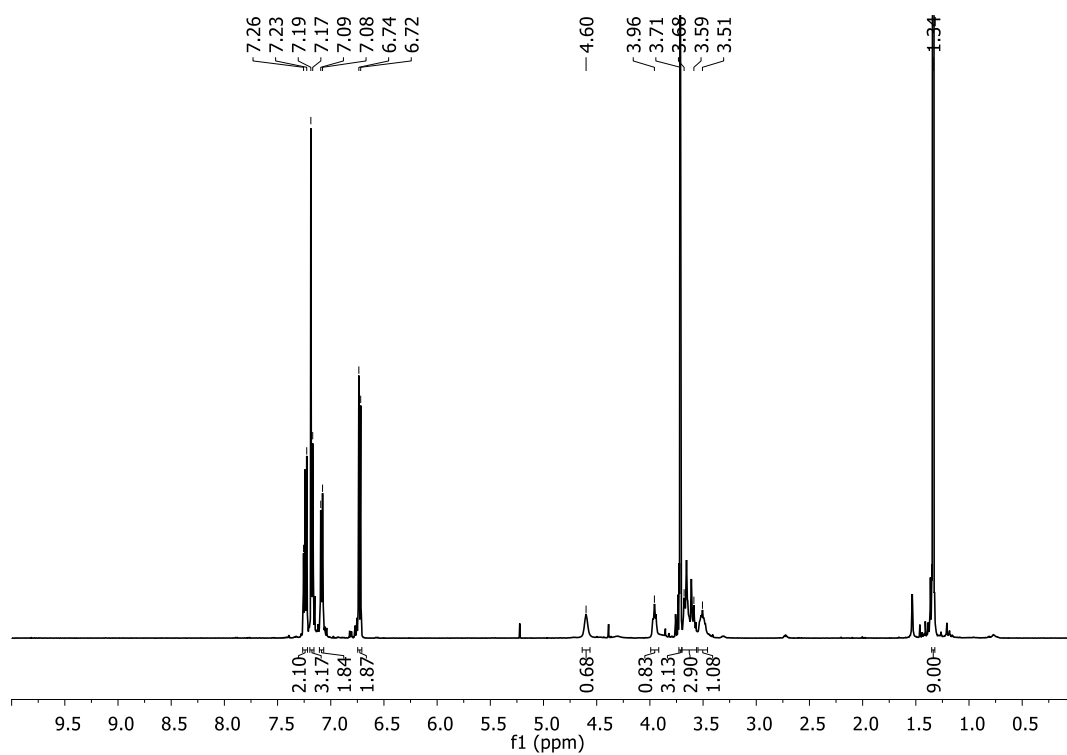
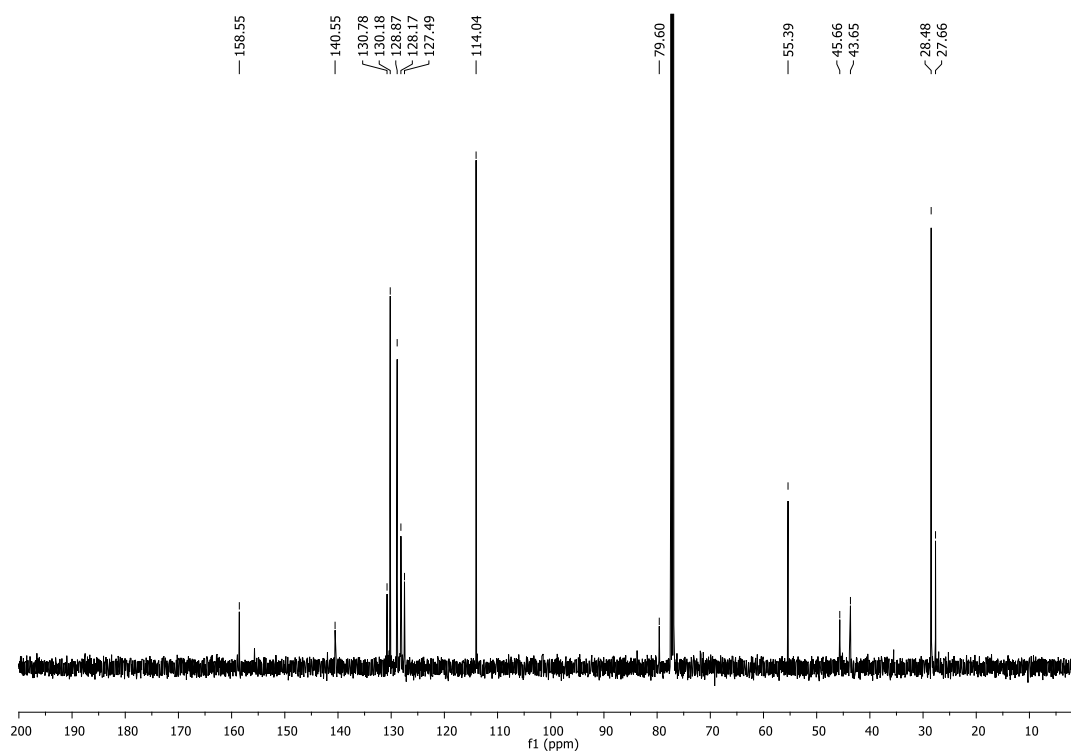
^1H -NMR: 2-(S-Trt)-Thioacetaldehyd **139** ^{13}C -NMR: 2-(S-Trt)-Thioacetaldehyd **139**

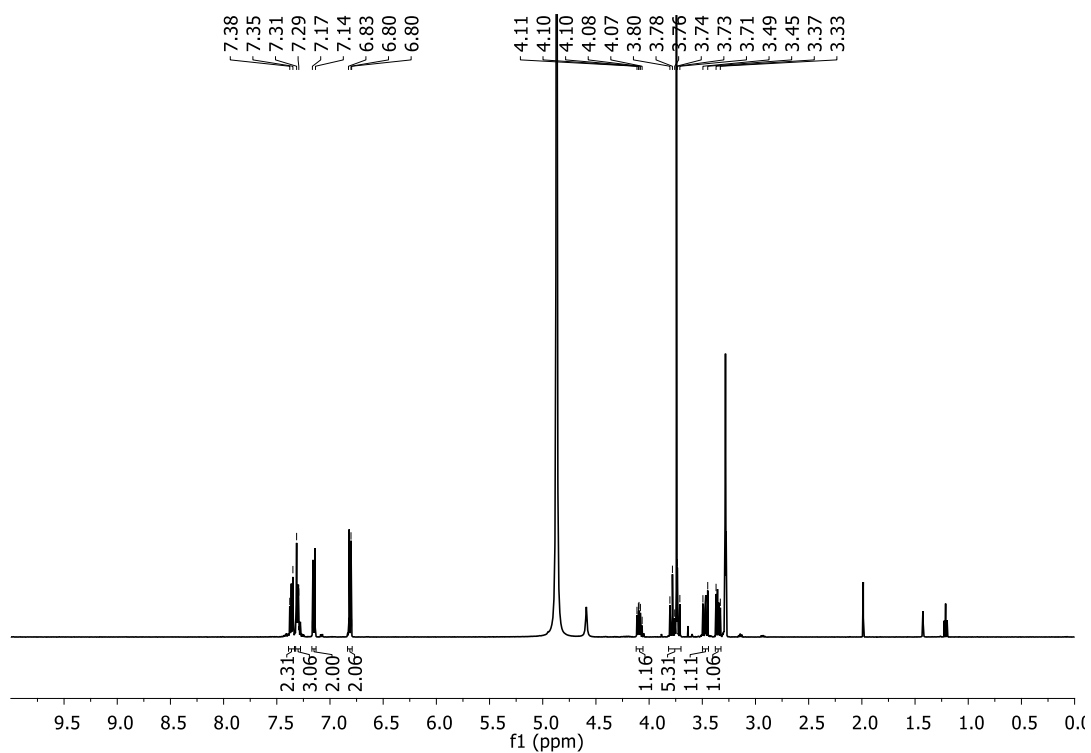
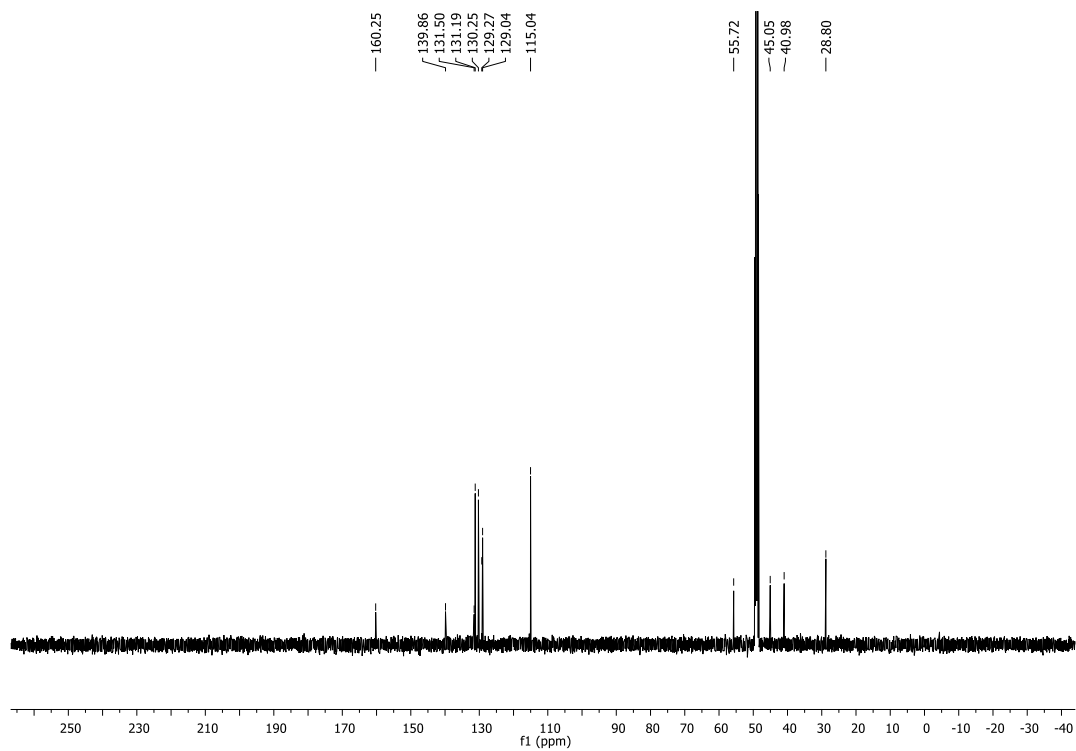
^1H -NMR: Xanthogenatester **141** ^{13}C -NMR: Xanthogenatester **141**

¹H-NMR: Thioether S2¹³C-NMR: Thioether S2

¹H-NMR: S-Trt-2-Mercapto-propanal **142**¹³C-NMR: S-Trt-2-Mercapto-propanal **142**

¹H-NMR: Diselenid **169**¹H-NMR: Mesylat **172**

^1H -NMR: PMB-Selenoether **178** ^{13}C -NMR: PMB-Selenoether **178**

^1H -NMR: PMB-geschützten 2-Seleno-Phenethylamins **179** ^{13}C -NMR: PMB-geschützten 2-Seleno-Phenethylamins **179**

8. Abkürzungsverzeichnis

2SPE	2-Selenol-2'-phenyl-ethyl
2ME	2-Mercapto-ethyl
2MP	2-Mercapto-propyl
2MPE	2-Mercapto-2'-phenyl-ethyl
5NP	5-ringbildendes Nitrophenyl-(Auxiliar)
6NP	6-ringbildendes Nitrophenyl-(Auxiliar)
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
ACN	Acetonitril
Äq.	Äquivalente
Aux	Auxiliar
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
DCD-1L	Dermcidin-1L
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N, N</i> , Diisopropylethylamin
Dmt	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol

EDC	1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EDMA	Ethyl dimethylamin
ENCI	erweiterte native chemische Ligation
EtOH	Ethanol
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EWG	Elektronenziehende Gruppe
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
Gew.-%	Gewichtsprozent
h	Stunde(n)
HPLC	<i>high performance/pressure liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HSQC	<i>heteronuclears quantum coherence</i>
<i>i</i> PrOH	Isopropanol
KAHA	<i>ketoacid hydroxylamine</i>
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)

MPAA	4-Mercaptophenylelessigsäure
MS	Massenspektrometrie
MsCl	Methansulfonsäurechlorid
MUC1	Mucin-1
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NCL	native chemische Ligation
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NTA	Nitrilotriessigsäure
OP2	Opistoporin-2
Oxa	Oxazolidin
RT	Raumtemperatur
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PhAcm	Phenylacetamidomethyl
PhSH	Thiophenol
(PhSe) ₂	Diphenyldiselenid
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat)
SPCL	<i>solid-phase chemical ligation</i>
SPPS	<i>solid-phase peptide synthesis</i>
<i>t</i> ₅₀	Zeit für 50% Ausbeute

TEMPO	2,2,6,6-Tetra- methylpiperidin-1-oxyl
<i>tert</i>	tertiär
tBu	tertiär Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl
HCTU	(2-(6-Chlor-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium- hexafluorophosphat)
t_R	Retentionszeit
UPLC	<i>ultra performance/pressure liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolett
VA-044	2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propan]
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
Vol.-%	Volumenprozent

9. Literaturverzeichnis

- [1] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, A. G. Beck-Sickinger, H. U., *Lehrbuch Biochemie*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2002**.
- [2] a) F. Baneyx, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 411-421; b) F. M. Wurm, *Nat Biotech* **2004**, *22*, 1393-1398.
- [3] a) B. Bommarius, H. Jenssen, M. Elliott, J. Kindrachuk, M. Pasupuleti, H. Gieren, K. E. Jaeger, R. W. Hancock, D. Kalman, *Peptides* **2010**, *31*, 1957-1965; b) S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* **2013**, *18*, 4373.
- [4] D. Goodwin, P. Simerska, I. Toth, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4451-4461.
- [5] a) K. Hilpert, D. F. H. Winkler, R. E. W. Hancock, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 1333-1349; b) V. Stadler, T. Felgenhauer, M. Beyer, S. Fernandez, K. Leibe, S. Güttler, M. Gröning, K. König, G. Torralba, M. Hausmann, V. Lindenstruth, A. Nesterov, I. Block, R. Pipkorn, A. Poustka, F. R. Bischoff, F. Breitling, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7132-7135; c) C. Katz, L. Levy-Beladev, S. Rotem-Bamberger, T. Rito, S. G. D. Rudiger, A. Friedler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2131-2145; d) R. Zitterbart, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7252-7256.
- [6] a) B. L. Bray, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 587-593; b) B. Thomas, M. Oleg, A. Fernando, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *5*, 29-43.
- [7] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- [8] L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5891-5896.
- [9] J. Offer, *Peptide Science* **2010**, *94*, 530-541.
- [10] E. Fischer, E. Fourneau, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868-2877.
- [11] K. S. A. Kumar, S. N. Bavikar, L. Spasser, T. Moyal, S. Ohayon, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6137-6141.
- [12] H. Yajima, N. Fujii, *Biopolymers* **1981**, *20*, 1859-1867.
- [13] a) M. Narita, K. Ishikawa, J.-Y. Chen, Y. Kim, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *24*, 580-587; b) S. Sakakibara, *Peptide Science* **1999**, *51*, 279-296.
- [14] S. B. H. Kent, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 338-351.
- [15] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [16] S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem* **1988**, *57*, 957-989.
- [17] R. B. Merrifield, *Science* **1965**, *150*, 178-185.
- [18] U. Langel, B. F. Cravatt, A. Graslund, N. G. H. von Heijne, M. Zorko, T. Land, S. Niessen, *Introduction to Peptides and Proteins*, CRC Press, Boca Raton **2009**.
- [19] R. Raz, F. Burlina, M. Ismail, J. Downward, J. Li, S. J. Smerdon, M. Quibell, P. D. White, J. Offer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13174-13179.
- [20] M. Beyermann, M. Bienert, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3745-3748.
- [21] *RCSB Protein database*, Eintrag 1A8E, Dargestellt mit JSmol.
- [22] V. Mäde, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Beilstein J. Org. Chem* **2014**, *10*, 1197-1212.
- [23] a) S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826-1844; b) H. M. Yu, S. T. Chen, K. T. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4781-4784.
- [24] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protocols* **2007**, *2*, 3247-3256.

- [25] a) Y. Sohma, A. Taniguchi, M. Skwarczynski, T. Yoshiya, F. Fukao, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3013-3017; b) I. Coin, R. Dölling, E. Krause, M. Bienert, M. Beyermann, C. D. Sferdean, L. A. Carpino, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 6171-6177.
- [26] a) T. Wöhr, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3847-3848; b) T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1589-1592.
- [27] V. Cardona, I. Eberle, S. Barthélémy, J. Beythien, B. Doerner, P. Schneeberger, J. Keyte, P. D. White, *Int J Pept Res Ther.* **2008**, 14, 285-292.
- [28] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, 34, 91-118.
- [29] a) H. P. Hemantha, N. Narendra, V. V. Sureshbabu, *Tetrahedron* **2012**, 68, 9491-9537; b) C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 10030-10074.
- [30] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 10068-10073.
- [31] E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640-6646.
- [32] H. Robert Horton, Laurence A. Moran, M. D. P. K. Gray Scrimgeour, J. D. Rawn, *Biochemie (4.te Auflage), Pearson studium, London* **2008**.
- [33] a) O. Reimann, M. Glanz, C. P. R. Hackenberger, *Biorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 2890-2894; b) M. Villain, H. Gaertner, P. Botti, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2003, 3267-3272.
- [34] L. Z. Yan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 526-533.
- [35] Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9248-9252.
- [36] a) D. Crich, A. Banerjee, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10064-10065; b) C. Haase, H. Rohde, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6807-6810; c) K. S. Ajish Kumar, M. Haj-Yahya, D. Olschewski, H. A. Lashuel, A. Brik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8090-8094; d) R. Yang, K. K. Pasunooti, F. Li, X.-W. Liu, C.-F. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13592-13593; e) J. Chen, P. Wang, J. Zhu, Q. Wan, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron* **2010**, 66, 2277-2283; f) Z. Harpaz, P. Siman, K. S. A. Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, 11, 1232-1235; g) S. Shang, Z. Tan, S. Dong, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10784-10786; h) P. Siman, S. V. Karthikeyan, A. Brik, *Org. Lett.* **2012**, 14, 1520-1523; i) L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *ChemBioChem* **2013**, 14, 559-563; j) R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9723-9727; k) K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2014**, 16, 290-293; l) L. R. Malins, K. M. Cergol, R. J. Payne, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 260-266; m) L. R. Malins, R. J. Payne, *Aust. J. Chem.* **2015**, 68, 521-537; n) J. Sayers, R. E. Thompson, K. J. Perry, L. R. Malins, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2015**, 17, 4902-4905.
- [37] a) H. Rohde, J. Schmalisch, Z. Harpaz, F. Diezmann, O. Seitz, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1396-1400; b) P. Siman, O. Blatt, T. Moyal, T. Danieli, M. Lebendiker, H. A. Lashuel, A. Friedler, A. Brik, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1097-1104.

- [38] a) T. Moyal, H. P. Hemantha, P. Siman, M. Refua, A. Brik, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 2496-2501; b) O. Reimann, C. Smet-Nocca, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 306-310.
- [39] R. E. Thompson, X. Liu, N. Alonso-García, P. J. B. Pereira, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8161-8164.
- [40] Y.-C. Huang, C.-C. Chen, S. Gao, Y.-H. Wang, H. Xiao, F. Wang, C.-L. Tian, Y.-M. Li, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7623-7628.
- [41] K. Sakamoto, S. Tsuda, M. Mochizuki, Y. Nohara, H. Nishio, T. Yoshiya, *Chem. Eur. J.* **2016**, n/a-n/a.
- [42] a) L. R. Malins, N. J. Mitchell, R. J. Payne, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 64-77; b) R. E. Huber, R. S. Criddle, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *122*, 164-173.
- [43] R. J. Hondal, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5140-5141.
- [44] a) N. Metanis, E. Keinan, P. E. Dawson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7049-7053; b) L. R. Malins, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3142-3145; c) S. D. Townsend, Z. Tan, S. Dong, S. Shang, J. A. Brailsford, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3912-3916.
- [45] L. R. Malins, N. J. Mitchell, S. McGowan, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 12716-12721.
- [46] N. J. Mitchell, L. R. Malins, X. Liu, R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, R. J. Payne, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14011-14014.
- [47] N. J. Mitchell, J. Sayers, S. S. Kulkarni, D. Clayton, A. M. Goldys, J. Ripoll-Rozada, P. J. Barbosa Pereira, B. Chan, L. Radom, R. J. Payne, *Chem* **2017**, *2*, 703-715.
- [48] a) J. Offer, P. E. Dawson, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 23-26; b) T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1403-1405; c) J. Offer, C. N. C. Boddy, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4642-4646; d) C. Nadler, A. Nadler, C. Hansen, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 3095-3102.
- [49] a) P. Botti, M. R. Carrasco, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1831-1833; b) D. W. Low, M. G. Hill, M. R. Carrasco, S. B. Kent, P. Botti, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 6554-6559; c) C. Marinzi, S. J. Bark, J. Offer, P. E. Dawson, *Biorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2323-2328; d) T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6059-6061; e) D. Macmillan, D. W. Anderson, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4659-4662; f) C. Marinzi, J. Offer, R. Longhi, P. E. Dawson, *Biorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2749-2757; g) S. Tchertchian, O. Hartley, P. Botti, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9208-9214; h) C. Bello, S. Wang, L. Meng, K. W. Moremen, C. F. W. Becker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7711-7715.
- [50] B. Wu, J. Chen, J. D. Warren, G. Chen, Z. Hua, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4116-4125.
- [51] C. Haase, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin* **2009**.
- [52] Z. Harpaz, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin* **2016**.
- [53] Z. Harpaz, S. Loibl, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 1434-1437.
- [54] a) A. Brik, S. Ficht, Y.-Y. Yang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15026-15033; b) A. Brik, Y.-Y. Yang, S. Ficht, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5626-5627; c) S. Ficht, R. J. Payne, A. Brik, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.*

- 2007, 46, 5975-5979; d) R. J. Payne, S. Ficht, S. Tang, A. Brik, Y.-Y. Yang, D. A. Case, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 13527-13536; e) Y.-Y. Yang, S. Ficht, A. Brik, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7690-7701.
- [55] M.-Y. Lutsky, N. Nepomniaschiy, A. Brik, *Chem. Commun.* **2008**, 1229-1231.
- [56] K. S. Ajish Kumar, Z. Harpaz, M. Haj-Yahya, A. Brik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 3870-3874.
- [57] G. L. Thomas, R. J. Payne, *Chem. Commun.* **2009**, 4260-4262.
- [58] H. Hojo, C. Ozawa, H. Katayama, A. Ueki, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5318-5321.
- [59] H. Chai, K. Le Mai Hoang, M. D. Vu, K. Pasunooti, C.-F. Liu, X.-W. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, n/a-n/a.
- [60] a) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141-2143; b) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007-2010; c) M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8820-8828.
- [61] A. Tam, R. T. Raines, *Methods Enzymol.* **2009**, 462, 25-44.
- [62] A. Tam, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11421-11430.
- [63] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1248-1252.
- [64] I. Pusterla, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 513-516.
- [65] F. Rohrbacher, T. G. Wucherpfennig, J. W. Bode, in *Protein Ligation and Total Synthesis II (Ed.: L. Liu)*, Springer International Publishing, Cham **2015**.
- [66] V. R. Pattabiraman, A. O. Ogunkoya, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5114-5118.
- [67] T. J. Harmand, C. E. Murar, J. W. Bode, *Nat. Protocols* **2016**, 11, 1130-1147.
- [68] M. Raj, H. Wu, S. L. Blosser, M. A. Vittoria, P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 6932-6940.
- [69] a) D. S. Kemp, F. Vellaccio, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 3003-3004; b) D. S. Kemp, *Biopolymers* **1981**, 20, 1793-1804; c) X. Li, H. Y. Lam, Y. Zhang, C. K. Chan, *Org. Lett.* **2010**, 12, 1724-1727.
- [70] L. E. Canne, P. Botti, R. J. Simon, Y. Chen, E. A. Dennis, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8720-8727.
- [71] L. Raibaut, H. Adihou, R. Desmet, A. F. Delmas, V. Aucagne, O. Melnyk, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 4061-4066.
- [72] A. Brik, E. Keinan, P. E. Dawson, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3829-3835.
- [73] M. Jbara, M. Seenaiah, A. Brik, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12534-12537.
- [74] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, 22, 4-27.
- [75] P. B. Anzeveno, D. P. Matthews, C. L. Barney, R. J. Barbuch, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3134-3138.
- [76] J. H. Clark, *Chem. Rev.* **1980**, 80, 429-452.
- [77] S. Brühl, *Forschungsbericht, Humboldt-Universität zu Berlin* **2014**.
- [78] H. Krawczyk, *Synth. Commun.* **1995**, 25, 3357-3362.
- [79] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2648-2650.
- [80] V. Y. Torbeev, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1667-1670.
- [81] <https://epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp>.

- [82] S. Oae, J. Doi, *Organic Sulfur Chemistry*, CRC Press Inc., Florida (USA) **1992**.
- [83] P. Dewick, *Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*, Wiley (Hoboken, New Jersey, USA) **2006**.
- [84] a) F. Ek, O. Axelsson, L.-G. Wistrand, T. Frejd, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6376-6381; b) E. L. A. COMPANY, WO2005/54202 A1 **2005**, 37.
- [85] B. Kaboudin, M. Khodamorady, *Synlett* **2010**, 2010, 2905-2907.
- [86] G. Illuminati, L. Mandolini, *Acc. Chem. Res.* **1981**, 14, 95-102.
- [87] K. Hennig, *Diplomarbeit*, Humboldt-Universität zu Berlin **2013**.
- [88] C. Juds, *Bachelorarbeit*, Humboldt-Universität zu Berlin **2013**.
- [89] J. Hioe, D. Sakic, V. Vrcek, H. Zipse, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 157-169.
- [90] a) P. Carloni, E. Damiani, M. Iacussi, L. Greci, P. Stipa, D. Cauzi, C. Rizzoli, P. Sgarabotto, *Tetrahedron* **1995**, 51, 12445-12452; b) Y. Araki, I. Koshiishi, *Biomed. Chromatogr.* **2016**, 30, 1131-1137.
- [91] M. J. Stone, R. J. Payne, *Acc. Chem. Res.* **2015**, 48, 2251-2261.
- [92] a) R. Stevens, L. Stevens, N. C. Price, *Biochemical Educ* **1983**, 11, 70-70; b) G. A. Bagiyani, I. K. Koroleva, N. V. Soroka, A. V. Ufimtsev, *Russ. Chem. Bull.* **2003**, 52, 1135-1141.
- [93] B. Schitteck, R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner, C. Garbe, *Nat Immunol* **2001**, 2, 1133-1137.
- [94] a) R. von Eggelkraut-Gottanka, A. Klose, A. G. Beck-Sickinger, M. Beyermann, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 3551-3554; b) B. L. Wilkinson, C. K. Y. Chun, R. J. Payne, *Peptide Science* **2011**, 96, 137-146.
- [95] L. Moerman, S. Bosteels, W. Noppe, J. Willems, E. Clynen, L. Schoofs, K. Thevissen, J. Tytgat, J. Van Eldere, J. van der Walt, F. Verdonck, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 4799-4810.
- [96] P. Liu, B. W. O'Mara, B. M. Warrack, W. Wu, Y. Huang, Y. Zhang, R. Zhao, M. Lin, M. S. Ackerman, P. K. Hocknell, G. Chen, L. Tao, S. Rieble, J. Wang, D. B. Wang-Iverson, A. A. Tymiak, M. J. Grace, R. J. Russell, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2010**, 21, 837-844.
- [97] M. Royo, J. Alsina, E. Giralt, U. Slomczynska, F. Albericio, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 1095-1102.
- [98] a) K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1969**, 2, 1-9; b) Y. Murakami, T. Oguchi, K. Hashimoto, Y. Nosaka, *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 13200-13208.
- [99] E. Furimsky, J. A. Howard, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 369-374.
- [100] a) J. K. Kochi, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 1193-1197; b) H. A. Headlam, M. J. Davies, *Free Radical Biol. Med.* **2002**, 32, 1171-1184.
- [101] E. A. Sturdik, M.; Sulo, P.; Balaz, S.; Durcova, E.; Drobnica, L., *Coll. Czech. Chem. Commun* **1985**, 50, 2065.
- [102] Lokesh Bhattacharyya, J. S. Rohrer, *Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products, First Edition*, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, USA, **2012**.

-
- [103] M. E. Jung, G. Piizzi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1735-1766.
- [104] R. Zitterbart, *Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin* **2017**.
- [105] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1455*, 301-313.
- [106] a) V. Aucagne, I. E. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A. F. Delmas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11320-11324; b) M. Galibert, V. Piller, F. Piller, V. Aucagne, A. F. Delmas, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3617-3623.
- [107] a) G. Stavropoulos, D. Gatos, V. Magafa, K. Barlos, *Lett. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 315-318; b) G.-M. Fang, Y.-M. Li, F. Shen, Y.-C. Huang, J.-B. Li, Y. Lin, H.-K. Cui, L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645-7649.
- [108] A. Honegger, G. J. Hughes, K. J. Wilson, *Biochem. J* **1981**, *199*, 53-59.
- [109] A. Śliwińska, A. Zwierzak, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5927-5934.
- [110] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.
- [111] a) S. F. Loibl, Z. Harpaz, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15055-15059; b) S. F. Loibl, Z. Harpaz, R. Zitterbart, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**.
- [112] a) H. Edelhoch, *Biochemistry* **1967**, *6*, 1948-1954; b) S. C. Gill, P. H. von Hippel, *Anal. Biochem.* **1989** *182*, 319-326.
- [113] B. J. H. Kuipers, H. Gruppen, *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 5445-5451.
- [114] G. Karabanovich, J. Roh, O. Soukup, I. Pavkova, M. Pasdiorova, V. Tambor, J. Stolarikova, M. Vejsova, K. Vavrova, V. Klimesova, A. Hrabalek, *MedChemComm* **2015**, *6*, 174-181.
- [115] M. Boni, L. Forti, F. Ghelfi, U. M. Pagnoni, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7897-7902.
- [116] T. Koide, H. Itoh, A. Otaka, H. Yasui, M. Kuroda, N. Esaki, K. Soda, N. Fujii, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1993**, *41*, 502-506.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Oliver Seitz, für das interessante Promotionsthema und die stetige professionelle Zusammenarbeit der letzten Jahre. Viele wissenschaftliche Erungenschaften dieser Arbeit wären ohne seine konstruktiven Vorschläge, Ideen und Bereitschaft zur ausgiebigen Diskussion vermutlich niemals erzielt worden. Zusätzlich möchte ich mich für die wissenschaftliche Freiheit bedanken, welche es mir ermöglichte eigene kleinere Forschungsprojekte zu verfolgen.

Ich danke meinen Erstkorrektoren, Dr. Robert Zitterbart und Dipl. Chem. Victor Bandlow („das hochkonzentrierte Adlerauge“), für die hilfreichen Verbesserungsvorschläge und nützlichen Anregungen.

Außerdem bedanke ich mich bei dem gesamten Arbeitskreis Seitz für die entspannte Arbeitsatmosphäre. Dabei danke ich speziell meinen Wegbegleitern des Labors 2'108, Dr. Frank Abendroth, Dipl. Chem. Victor Badlow und M. Sc. Richard Houzka, für den angenehmen Laboralltag. Ein großes Lob geht auch an meine „Azubis“ André Reinprecht, Lukas Paudler und Kevin Höhne für deren tatkräftige Unterstützung. Desweiteren bedanke ich mich bei Dipl. Chem. Kathleen Hennig, M. Sc. Carmen Juds, B. Sc. Stephan Greiff, M. Sc. Sebastian Brühl, B. A. Medicinal Chemistry Donncha O'Cearbhaill, und M. A. David Horstman für die Zusammenarbeit im Rahmen der jeweiligen Forschungsprojekte. Für die tolle Kooperation auf dem NMR-Projekt und das stetige Interesse danke ich Dr. André Dallmann.

Ein besonderer Dank geht an meine großartigen Eltern, Marion und Georg Loibl, für die fortlaufende Förderung und Unterstützung während der Schulzeit, des Studiums und der Promotion. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner eigenen kleinen „Familie Loibl“ bedanken, welche mich die Lasten des Arbeitsalltages in wenigen Sekunden vergessen lies. Dem stetigen Einsatz und Verständniss meiner Frau, Natalia Loibl, ist es zu verdanken, dass ich wichtige Arbeiten auch am Abend oder an den Wochenenden immer mit voller Motivation und Konzentration erledigen konnte und dabei stets einen positiven Blick auf die Zukunft bewahrte. Ein besonderer Dank gilt meiner Tochter, Maja Loibl, für jedes Lächeln und all die schönen Momente, welche mir immer wieder neue Kraft für die anstehenden Strapazen der Promotion spendeten.

Publikationsverzeichnis

- [1] "Brightness through Local Constraint - LNA-Enhanced FIT Hybridization Probes for In Vitro Ribonucleotide Particle Tracking": F. Hövelmann, I. Gaspar, **S. Loibl**, E.A. Ermilov, B. Röder, J. Wengel, A. Ephrussi, O. Seitz, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2014**, 53, 11370-11375.
- [2] "A Type of Auxiliary for Native Chemical Peptide Ligation beyond Cysteine and Glycine Junctions": **S. F. Loibl**, Z. Harpaz, O. Seitz, *Angew.Chem.Int.Ed.* **2015**, 54, 15055–15059.
- [3] "Native chemical ligation at a base-labile 4-mercaptobutyrate N α -auxiliary": Z. Harpaz, **S. F. Loibl**, O. Seitz, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2016**, 26, 1434-1437.
- [4] "Total chemical synthesis of proteins without HPLC purification": **S.F. Loibl**, Z. Harpaz, R. Zitterbart, O. Seitz, *Chem. Sci.* **2016**, 7, 6753-6759.

Wissenschaftliche Konferenzen

- [1] "Extending auxiliary-mediated peptide ligation": 12th German Peptide Symposium 2015, Darmstadt.
- [2] "Extending auxiliary-mediated peptide ligation": 34th European Peptide Symposium 2016, Leipzig.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ort, Datum

Simon Loibl